

Aus dem

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
(komm. Leiter Prof. Dr. M. Lohoff) des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität  
Marburg in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Giessen und Marburg  
GmbH, Standort Marburg

# Molekulare Charakterisierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus* *aureus* mittels *spa*-Typisierung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Kristina Wewers

aus Recklinghausen

Marburg/Lahn 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 13.03.2008.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. R. Mutters

Korreferent: Prof. Dr. A. Sziegoleit

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| 1. Einleitung  | 4  |
| 1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>                    | 4  |
| 1.2. Methicillinresistenz                            | 5  |
| 1.3. Epidemiologie                                   | 7  |
| 1.4. Prävention                                      | 8  |
| 1.5. Charakterisierungsmethoden von <i>S. aureus</i> | 11 |
| 1.5.1. Phänotypische Charakterisierung               | 11 |
| 1.5.2. Genetische Charakterisierung                  | 11 |
| 2. Fragestellung                                     | 14 |
| 3. Material und Methoden                             | 15 |
| 3.1. Patienten und Studiendesign                     | 15 |
| 3.2. Bakterienstämme und Kulturmedium                | 15 |
| 3.3. DNA-Aufreinigung                                | 16 |
| 3.4. DNA-Amplifikation und Polymerasekettenreaktion  | 17 |
| 3.5. DNA-Sequenzierung                               | 18 |
| 3.6. Pulsfeldgelelektrophorese                       | 21 |
| 3.7. <i>spa</i> -Typisierung                         | 23 |
| 4. Ergebnisse  | 25 |
| 4.1. Probenmaterial                                  | 25 |
| 4.2. <i>spa</i> -Typisierung                         | 25 |
| 4.3. PFGE  | 26 |
| 4.4. Methodenvergleich                               | 27 |
| 4.5. Patienten                                       | 28 |
| 4.6. Epidemiologie                                   | 29 |
| 5. Diskussion  | 31 |
| 6. Zusammenfassung                                   | 42 |
| 7. Appendix  | 44 |
| 7.1. Tabellen  | 44 |
| 7.2. Abbildungen                                     | 49 |
| 7.3. Abkürzungen                                     | 56 |
| 7.4. Literaturverzeichnis                            | 58 |
| 7.5. Verzeichnis der akademischen Lehrer             | 63 |
| 7.6. Danksagungen                                    | 64 |

# 1. Einleitung

## 1.1. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist einer der wichtigsten bakteriellen Infektionserreger des Menschen. Die Gattung *Staphylococcus* gehört zur Familie der *Micrococcaceae*. Auf vielen künstlichen Nährböden ist er ohne weitere Schwierigkeiten anzüchtbar. Die Spezies ist gegen UV-Strahlen, Hitze und Austrocknung relativ resistent. Dabei dient das goldgelb scheinende und namensgebende Pigment, das zu den Karotinoiden gehört, als Schutzfaktor. Zelloberflächenstrukturen und extrazelluläre Produkte von *S. aureus* sind als potentielle Virulenzfaktoren identifiziert worden. Antiphagozytäre Eigenschaften hat zum Beispiel Protein A, welches Immunglobuline über deren Fc-Stück bindet und so Phagozyten keinen Angriffspunkt mehr bietet. Auch die Polysaccharidkapsel wirkt antiphagozytär. Zur Adhäsion tragen der Clumpingfaktor (Fibrinogenrezeptor) mit einer Verklumpung von Plasma, durch die Aktivierung von Fibrinogenmonomeren sowie die Fibronectin-Bindeproteine bei. Zu den extrazellulären Produkten zählen Plasmakoagulase, Leukozidin, Hämolysin, Hyaluronidase und Exfoliativtoxine. *S. aureus* verursacht pyogene Infektionen, wie Wundinfektionen, Pneumonie und Sepsis oder Toxin-vermittelte Infektionen, wie das Toxic Shock Syndrom (TSS) (PULVERER 2001). *S. aureus* kommt auch bei einem Großteil der Bevölkerung als Bestandteil der normalen Haut- und Schleimhaut, insbesondere als eine Besiedlung des Nasenvorhofs vor. Die ersten Resistenzen gegen Penicillinase-feste Antibiotika, wie Methicillin, wurden in den frühen 1960er Jahren in England und Dänemark beobachtet (CRISOSTOMO 2001). Die Entstehung solcher resistenter Stämme gegen Methicillin und andere antibiotische Substanzen stellt ein großes therapeutisches Problem dar. Hauptmanifestation sind vor allem chirurgische Wunden, aber auch chronische Wunden, wie z.B. Dekubitus, der Respirationstrakt und Implantate. Besonders problematisch ist die MRSA-Sepsis, die im Vergleich zur Sepsis mit Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) mit einer signifikant erhöhten Mortalität einhergeht (COSGROVE 2003). Ursache der erhöhten Mortalität ist zum Teil die geringe klinische Wirksamkeit der therapeutischen Alternativen und häufig eine verzögerte Therapie. Prädisponiert für Infektionen sind Personen mit Hauterkrankungen, Verbrennungen, Virusinfektionen, Neugeborene oder Multimorbide. Auch Hospitalisierung über einen längeren Zeitraum stellt einen Risikofaktor für eine Kolonisation bzw. eine Infektion mit MRSA dar.

## 1.2. Methicillinresistenz

Seit der Entdeckung des Penicillins durch A. Fleming 1928 und dem therapeutischen Einsatz des Antibiotikums 1940 entstanden schnell Resistenzen bei *S. aureus*. Durch die Bildung von Penicillinasen bzw. Betalactamasen wird der  $\beta$ -Lactamring dieser Antibiotika gespalten und die Präparate somit unwirksam. Seit der Einführung des ersten penicillinasefesten Antibiotikums Methicillin 1959 entwickelten sich innerhalb kurzer Zeit schon Anfang der 1960er Jahre die ersten MRSA-Stämme in Europa (CRISOSTOMO 2001) und in den 1970er Jahren in den USA (PANLILIO 1992). Bei der Untersuchung des Resistenzmechanismus wurde in allen MRSA-Stämmen das *mecA*-Gen gefunden sowie weitere kontrollierende DNA-Elemente. Das *mecA*-Gen kodiert für ein 76 kD Zellwandprotein, das Penicillinbindeprotein 2a (PBP2a). Dieses besitzt nur eine äußerst geringe Affinität zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Alle *S. aureus*-Stämme bilden Transpeptidasen zur Synthese der Zellwand, die der Angriffspunkt für  $\beta$ -Lactamantibiotika sind und wegen ihrer hohen Affinität zu diesen Antibiotika auch Penicillinbindungsproteine genannt werden. PBP2a kann wegen der geringen Bindungsrate auch in Anwesenheit von Methicillin die Zellwandsynthese aufrecht erhalten und übernimmt so die Aufgabe der inhibierten Penicillinbindungsproteine (CHAMBERS 1997). Somit ist das *mecA*-Gen ausschlaggebend für die Resistenz gegenüber Methicillin und anderen  $\beta$ -Lactam Antibiotika, das heißt nicht nur Penicilline, sondern auch Carbapeneme und Cephalosporine. Es konnte gezeigt werden, dass das *mecA*-Gen Teil eines Genelements ist, das „staphylococcal cassette chromosomal mec“ (SCCmec), welches in das *S. aureus* Chromosom integriert ist. SCCmec ist 52 kb lang und beinhaltet unter anderem auch die Rekombinasen, *ccrA* und *ccrB*, die für ein exaktes Ausschneiden des Kassettenchromosoms und die Integration in ein neues Genom verantwortlich sind. Die Rekombinasen haben somit eine entscheidende Rolle im Übertragungsweg von MRSA auf andere Bakterienstämme inne (KATAYAMA 2000). Drei Varianten des SCCmecs sind nachgewiesen, was die These des oligoklonalen Ursprungs von MRSA weiterhin unterstützt (ITO 2001).

Im Kassettenchromosom sind weitere kodierende Abschnitte, wie *mecA*-Regulatoren, *fem*-Gene, Tn 554 für die Erythromycinresistenz oder IS 431 für multiple Resistenzen gegen Antibiotika identifiziert worden.

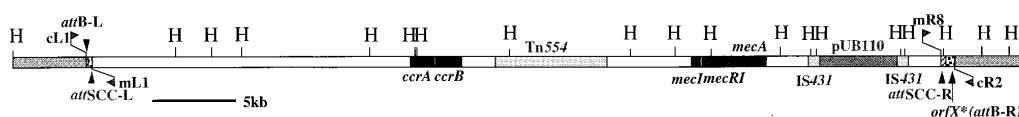


Abbildung 1.2-1: Genstruktur des SCCmec (KATAYAMA 2000)

Weiter bekannte Resistenzformen von MRSA sind solche vom heterogenen oder Borderlinertyp. Die heterogene Resistenz ist nicht durch *mecA* kodiert, wodurch sie a priori vorhanden wäre, sondern ist abhängig von den Kultivierungsbedingungen wie z.B. einem hypertonischen Medium mit NaCl bzw. Saccharose oder einer Inkubation bei 30°C. Unter diesen Bedingungen kann eine vorübergehende Resistenz entstehen und bildet sich in einem antibiotikafreien Medium vollständig zurück (CHAMBERS 1997).

Borderliner-Resistenzen bieten einem Antibiotikum bis zu einer gewissen Konzentration keinen Angriffspunkt. Es gibt zwei Arten dieser Resistenz, *mecA*-positive und -negative. Die Ursache, warum solche, die das *mecA*-Gen besitzen und PBP2a produzieren, dennoch sensibel ab einer gewissen Konzentration von Antibiotika sind, ist die zu geringe Produktion des Proteins. *mecA*-negative Resistenzen resultieren aus einer Überproduktion an  $\beta$ -Lactamasen und bzw. oder einer Modifikation von PBPs (TOMASZ 1989).

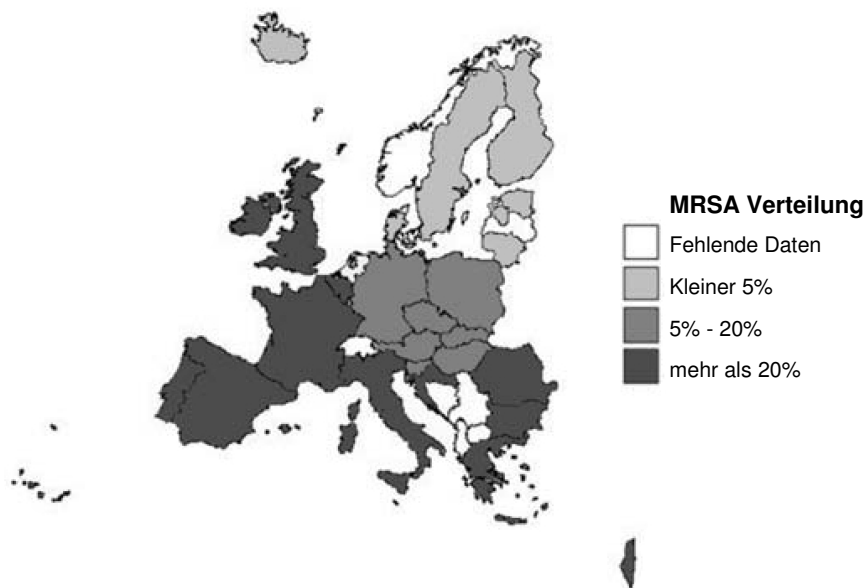
Aufgrund der häufigen Resistenzen gegen Erythromycin, Aminoglykosiden und Flourochinolone ist in vielen Fällen die einzige therapeutische Option die Behandlung mit Glykopeptiden, oft in Kombination mit Rifampicin, Clindamycin oder Linezolid. Daher ist es um so besorgniserregender, dass seit der Erstbeschreibung 1996 (HIRAMATSU 1997) regelmäßig steigende Zahlen von Glykopeptid bzw. Vancomycin intermediär empfindliche MRSA-Isolate (GISA) bekannt gegeben werden (APPELBAUM 2006a). Auch die Anzahl der Vancomycin-resistenten *S. aureus* (VRSA)-Stämmen ist gestiegen. Der erste Fall von VRSA wurde Juni 2002 in Michigan/USA veröffentlicht. Drei weitere Stämme wurden identifiziert: Pennsylvania/USA (September 2002), New York/USA (2004), Michigan/USA (2005). Damit sind insgesamt bis dato vier Stämme von VRSA beschrieben (CDC 2002a; CDC 2002b; CDC2004; APPELBAUM 2006b; TENOVER 2004).

Seit mehreren Jahren tritt ein neuer MRSA-Typ auf, der sogenannte community acquired MRSA (cMRSA). Er unterscheidet sich in seinem Genotyp vom nosokomialen MRSA und ist nicht verwandt mit den Epidemiestämmen. Als einheitliches Charakteristikum wurde *lukS-lukF* identifiziert, das Panthon-Valentin-Leukozidin (PVL) determiniert: ein porenbildendes Toxin, das mit nekrotisierenden Haut- und Weichteilinfektionen und nekrotisierender Pneumonie assoziiert ist. Außerdem wurde ein neuer Typ des SCCmec-Elementes nachgewiesen, der Typ IV. Dieses

Kassettenelement ist kleiner, beinhaltet das *mecA*-Gen, allerdings fehlen einige weitere Resistenzdeterminanten (MA 2002). Es ist gegen Methicillin und andere  $\beta$ -Lactame und Fusidinsäure resistent, besitzt aber keine Multiresistenzen. In der Regel ist er für nicht- $\beta$ -Lactamantibiotika empfindlich.

### 1.3. Epidemiologie

Der Anstieg von Methicillin-resistenten *S. aureus* ist eine der Ursachen der weltweiten Zunahme von nosokomialen Infektionen. Einige Stämme sind zu einer europaweiten bis hin zu einer weltweiten Verbreitung gelangt. Diese Stämme sind in Europa durch molekulare Typisierungsmethoden als Epidemiestämme identifiziert worden. Diesbezüglich gibt es keine Unterschiede zwischen den einzelnen Ländern, die Stämme sind grenzüberschreitend. Wohl aber in der Häufigkeit von MRSA gibt es Differenzen bei den Ländern. In Portugal, Frankreich, Spanien und Italien wurde schon in den 1980er Jahren von einem Anstieg berichtet, in Großbritannien und Deutschland in den 1990er Jahren. So stieg hier der Anteil von MRSA an allen *S. aureus* Isolaten von 8% auf 20% im Zeitraum von 1995 bis 2001. Aktuell wird von einer MRSA-Rate von ~27% ausgegangen. Im Unterschied dazu blieb der prozentuale Anteil von MRSA in bestimmten Ländern, wie den Niederlanden, Dänemark, Schweden und Finnland über Jahre auf sehr niedrigem Niveau (<2%) oder stieg nur geringfügig an.



**Abbildung 1.3-1: Geographische Verteilung der MRSA Raten in Europa (1999-2002) (TIEMERSMA 2004)**

In Deutschland ist die MRSA-Häufigkeit ungleichmäßig hoch und variiert nach Erfassungsmethode. Die Zahlen schwanken zwischen den einzelnen Krankenhäusern,

jedoch besonders innerhalb der Häuser je nach Risikobereich. Die verschiedenen klinischen Disziplinen sind unterschiedlich häufig von MRSA betroffen. Im Vordergrund stehen dabei Intensivstationen, insbesondere chirurgische Intensivstationen, sowie Stationen für die Behandlung von Neugeborenen und Brandverletzten. So ergaben die Erhebungen je nach Risikobereich Ergebnisse von 0%-35%, in Einzelfällen sogar bis zu 60%.

Eine Erfassungsmethode, um an Daten in deutschen Krankenhäusern zu gelangen, ist das Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS). Bei freiwilliger Teilnahme der Krankenhäuser beobachtete es verschiedene Risikobereiche, wie z.B. 200 Intensivstationen. Von 1997 bis 2003 stiegen auf diesen Intensivstationen die Häufigkeit von MRSA als Anteil aller *S. aureus* Isolate im Mittel von 8% auf 30%. Der Anteil von MRSA der primären *S. aureus* Sepsis lag bei 37,8%, der Anteil der nosokomialen Pneumonie bei 21,5%.

2004 wurde in mehr als der Hälfte der MRSA-Nachweise eine Besiedlung ohne Infektion beobachtet. Ein positiver Nachweis von MRSA innerhalb von 48h nach Aufnahme, als Kriterium für einen nicht nosokomial erworbenen MRSA, würde die Anzahl der nosokomial erworbenen um die Hälfte reduzieren. Es wird davon ausgegangen, dass die Verbreitung überwiegend durch Verlegung oder Aufnahme von MRSA besiedelten oder infizierten Patienten stattfindet (WITTE 1994). Das heißt, je höher die mittlere tägliche MRSA-Prävalenz (MRSA Tage/100 Patiententage), desto häufiger erfolgt die Besiedlung weiterer Patienten („Kolonisationsdruck“). Mit diesen Daten bestätigt KISS auch die Studien in anderen Ländern mit derselben Schlussfolgerung (MERRER 2000). Einen weiteren Vektor für die Verbreitung im Krankenhaus stellt kolonisiertes aber nicht erkranktes Personal dar.

cMRSA bildete im Jahr 2004 in Deutschland einen Anteil von ~1,1% aller an das Nationale Referenzzentrum (NRZ) für Staphylokokken in Werningerode eingesandten Isolaten. Infektionen traten bisher nur vereinzelt auf und sind über das gesamte Bundesgebiet gleichmäßig verteilt. Ein Reservoir für cMRSA ist bisher nicht bekannt (WITTE 2005).

#### **1.4. Prävention**

Das Niedrigniveau der MRSA-Isolate einiger skandinavischer Länder und der Niederlande geht auf strikte Präventionsmaßnahmen der Weiterverbreitung zurück. In



Slowenien wurde zuletzt nach verstärkten Präventionsbemühungen über einen erheblichen Rückgang von MRSA berichtet (TIEMERSMA 2004).

Infektionen mit MRSA geht fast immer eine Kolonisation voraus, und die daraus resultierende Infektion geht mit höherer Morbidität und Letalität sowie mit erhöhten Kosten für Pflege und Therapie einher (COSGROVE 2003). Die Prävention hat daher höchste Priorität. Die wichtigsten Maßnahmen bestehen aus der Identifizierung, Erfassung und Bewertung von MRSA, dem Einhalten geeigneter Hygienemaßnahmen, der Sanierung von MRSA-Trägern und dem kontrollierten Einsatz zur Vermeidung eines die Verbreitung von MRSA fördernden Selektionsdrucks.

Für die praktische Umsetzung des MRSA-Managements ist es wichtig, Cluster von MRSA rasch zu erkennen, die hausinterne Resistenzentwicklung und den Kolonisationsdruck zu beurteilen, Risikobereiche, wie z.B. chirurgische Intensivstationen zu identifizieren und vor allem eine Sensibilisierung des medizinischen Personals sowie der Kostenträger bzw. der Verwaltung für das Problem zu erreichen. Wünschenswert wäre auch ein Aufnahmescreening für Risikopatienten mit dem Ziel, den Kolonisationsdruck in einem Krankenhaus unterhalb einer kritischen, die Ausbreitung fördernde Schwelle zu halten. Erfahrungsberichte zeigen, dass eine solche Maßnahme zu einer Reduktion der Rate nosokomialer MRSA-Infektionen führt. Die Vermeidung nosokomialer Infektionen und die suffiziente Behandlung dieser durch eine sofort zur Verfügung stehende, dem Trägerstatus adäquate angepasste Antibiotikatherapie ist kostensenkend.

Hygienemaßnahmen, die geeignet sind die Weiterverbreitung von MRSA zu kontrollieren, sind eine tragende Säule eines erfolgreichen MRSA-Managements. Dabei sollte die Grundlage der Hygienemaßnahmen auf der entsprechenden Richtlinie des Robert Koch-Instituts basieren. Diese regelt u.a. die räumlich-funktionelle Anforderung an die Unterbringung von MRSA-Patienten, den Schutz vor Kontamination, Desinfektion und Reinigung von Kontaktgegenständen, die Abfallentsorgung, Maßnahmen zu Eingriffen am Patienten, Screeninguntersuchungen, Sanierung von MRSA-Trägern, Bedingungen zur Aufhebung der Isolierung und Entlassung sowie Maßnahmen bei Verlegungen oder Transporten (KOMMISSION FÜR KRANKENHAUSHYGIENE UND INFEKTIONSPRÄVENTION AM ROBERT KOCH-INSTITUT 2004). Sie werden jedoch durch eine erhebliche Anzahl an Faktoren behindert. Das sind z.B. Compliance-Probleme des Personals, der Patienten und

Besucher, Personalfluktuaton und Unterbesetzung, hohe Kosten für Isolierung und Material sowie die Belastung des Patienten durch die „Stigmatisierung“. Um dem entgegenzuwirken steht die fachkundige Schulung im Vordergrund, um Wissen und Sensibilisierung für das Thema zu verbreiten.

Das Screening auf MRSA wird in der Richtlinie nicht als routinemäßige Untersuchung von Patienten oder medizinischem Personal gefordert. Jedoch verweist das Robert Koch-Institut auf die Identifikation potentieller MRSA-Träger. Ein erhöhtes Risiko für eine MRSA-Kolonisation im Sinne der Empfehlung besteht bei Patienten mit einer bekannten MRSA-Anamnese, verlegten Patienten aus Einrichtungen oder Regionen mit erhöhter MRSA-Prävalenz, Patienten, die Kontakt zu MRSA-Trägern hatten oder solche, die mindestens zwei Risikofaktoren für eine MRSA-Infektion aufweisen. Zu diesen Risikofaktoren gehören: chronische Pflegebedürftigkeit, liegender Katheter (Bsp. Harnblasenkatheter, PEG-Sonde), Dialysepflicht, Brandverletzungen, Hautulcus, Gangrän, chronische Wunden und tiefe Weichteilinfektionen (BGB 1999).

Die Sanierung von MRSA-Trägern stellt vor allem bei Patienten mit Risikofaktoren für MRSA und zahlreichen Vorerkrankungen einen großen Aufwand dar. Die Sanierung ist unbedingt mit antibakteriellen Wirkstoffen durchzuführen, deren klinische Wirksamkeit für diese Anwendung nachgewiesen ist. So stehen für die Behandlung nasaler MRSA-Besiedlungen antibiotische Nasensalben zur Verfügung, Besiedlungen der Haut mit MRSA können mit antiseptisch wirkenden Seifen und Lösungen behandelt werden. Bei Besiedlung mit MRSA von medizinischem Personal ist ebenfalls eine Sanierung empfohlen (BGB 1999).

Der hohe Aufwand der Dekontaminationstherapie zeigt sich als effektiv. Sowohl MRSA-Träger ohne Risikofaktoren als auch solche mit Risikofaktoren können mit einer hohen Erfolgsquote saniert werden. Mit einer Kontrolle der Therapie von sechs Monaten Abstand, bei der das Vorliegen von Risikofaktoren und der positive Abstrich von MRSA untersucht wird, konnten in einer Studie in den Niederlanden innerhalb eines Jahres 95% der Patienten ohne Risikofaktoren mit negativem MRSA-Abstrich aus der Therapie entlassen werden, bei 89% der Patienten mit Risikofaktoren war die Therapie nach zwei Jahren erfolgreich (VRIENS 2005).

Auch in Langzeitpflegeeinrichtungen, die ein MRSA-Reservoir im besonderen Maße darstellen, ist ein regelmäßiges Screening und eine intensiv durchgeführte

Erdikationstherapie der Patienten und des Personals angemessen und erfolgreich (KOTILAINEN 2001).

Zum kontrollierten Einsatz von Antibiotika sind Arzneimittelkommissionen und Antibiotikaleitlinien zu etablieren, die den Antibiotikaeinsatz transparent machen. Des Weiteren ist eine kontinuierliche fachkundige Beratung zum Antibiotikaeinsatz in Risikobereichen zu empfehlen (WITTE 2005).

## **1.5. Charakterisierungsmethoden von *S. aureus***

### **1.5.1. Phänotypische Charakterisierung**

Verschiedene phänotypische Charakterisierungsmethoden wurden zur Überwachung der Epidemiologie von *S. aureus* entwickelt. Verfahren, wie Kapsel-Polysaccharid-Serotypisierung, die Kontrolle spezifischer Stoffwechselprodukte, also biochemische Tests, Antibiotikaresistenzbestimmung und Bestimmung des Phagenlysotyps, dienen alle der Erstellung eines Eigenschaftsprofils der einzelnen *S. aureus* Stämme. Klassische Methode zur Überwachung der epidemiologischen Ereignisse war die Phagenlysotypie. Dabei werden Phagen mit unterschiedlichen lysogenen Eigenschaften, die unterschiedlichen Lysogruppen zugeordnet sind, eingesetzt. Spezifische Bestandteile an der Zelloberfläche der untersuchten *S. aureus* Stämme spielen bei der Absorption der Phagen eine Rolle, so dass bestimmte Phagen nur eine Auswahl an Stämmen lysieren können.

Aufgrund der wesentlich höheren Differenzierung unter den Isolaten durch genetische Charakterisierungen werden die phänotypischen Charakterisierungen nicht mehr durchgeführt. Da Antibiotikaresistenzen jedoch routinemäßig erfasst werden, können sie intern im Krankenhaus als epidemiologischer Marker zusätzlich eine Rolle spielen.

### **1.5.2. Genetische Charakterisierung**

#### **1.5.2.1. Molekulare Typisierungsmethoden**

Seit den 1980er Jahren wurden molekulare Typisierungsmethoden entwickelt. Epidemiologische Untersuchungen von Verwandtschaften auf Stammniveau drängten phänotypische Charakterisierungstechniken immer mehr in den Hintergrund. Diese Methoden leisten eine hohe Diskriminierung und eine hohe Reproduzierbarkeit chromosomaler DNA-Muster, die im Gegensatz zu phänotypischen Methoden nicht von

Umweltbedingungen abhängig sind. Eine bedeutende Stellung unter diesen Techniken nimmt die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) ein. Sie ist eine der ersten Entwicklungen und eine der am weitesten verbreitetste. Sie gilt auch heute noch als Goldstandard (MURCHAN 2003). Weitere Methoden zur genetischen Charakterisierung sind die Analysen von verschiedenen Genen, Multi Locus Sequenz Analyse (MLST) oder die eines einzelnen Gens, Single Locus Analyse, wie z.B. das *spa*-Gen.

#### 1.5.2.2. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Für die PFGE wird die chromosomale DNA des Bakteriums durch selten schneidende Restriktionsendonukleasen in große Fragmente zerteilt. Durch eine für kurze Zeit, aber sich regelmäßig ändernde Richtung des elektrischen Feldes ist mittels PFGE die Trennung von größeren Fragmenten möglich. Es gibt verschiedene Methoden des Änderungsmusters des elektrischen Feldes, wobei die einfache Feldumkehrung (field inversion electrophoresis) die meist verbreitete ist. Fragmente von 10-2000 kb können dabei getrennt werden. Die Auflösung hängt darüber hinaus von den verschiedenen Parametern wie Spannung, Pulszeit, Temperatur des Gels, Puffer oder Agarosekonzentration ab. Die Laufzeit im Vergleich zur normalen Gelelektrophorese ist um ein Vielfaches erhöht (MÜLHARDT 2002; TENOVER 1995). Die durch Restriktionsendonukleasen fragmentierte chromosomale DNA hinterlässt nach der PFGE ein typisches Bandenmuster im Gel. Verglichen mit andern Bandenmustern lassen sich Ähnlichkeitsaussagen zu den einzelnen Isolaten treffen. Dabei werden Isolate mit drei oder weniger unterschiedlichen Banden als gleich betrachtet (TENOVER 1995).

#### 1.5.2.3. Multi Locus Sequenz Typisierung (MLST)

In einer real-time PCR wird der für die Untersuchung benötigte Genabschnitt des Isolats vervielfältigt. Das entstandene PCR-Produkt wird in die Sequenzierreaktion eingesetzt und sequenziert. Für die MLST wird eine Sequenz von ~450bp untersucht. Innerhalb dieses Abschnitts befinden sich bei *S. aureus* Fragmente von sieben „housekeeping“ Genen. Jedem dieser Genfragmente sind aufgrund von unterschiedlichen Basensequenzen eindeutige Allele zugeteilt. Abhängig von der Kombination unterschiedlicher Allele wird ein Allelprofil erstellt und diesem ein Sequenzier-Typ (ST) zugeteilt. Da es sehr viele verschiedene Allele für die einzelnen Genorte gibt, lassen sich für gleiche Allelprofile bzw. ST-Gruppen Aussagen über Verwandtschaftsverhältnisse der Stämme treffen (ENRIGHT 2000).

Daten der Sequenzanalyse können leicht zwischen Laboren ausgetauscht und verglichen werden. So ist es auch möglich, Daten und Ergebnisse verschiedener Studien über das Internet miteinander zu vergleichen (SPRATT 1999). Als Datenbank für die ST von *S. aureus* sowie für viele andere Bakterienspezies steht die Oxford-Datenbank im Internet (<http://www.mlst.net>) zur Verfügung.

#### 1.5.2.4. Singel Locus Sequenz Typisierung (Bsp. *spa*-Gen)

Das Protein A Gen besteht aus einer polymorphen Region X bzw. einer short sequence repeat Region (SSR), die als *spa*-Gen bezeichnet wird und aus stabilen Regionen, wie die Fc-Binderegion und der C-Terminus, die die Region X flankieren. Dies macht den Einsatz von Primern in der PCR und für die Sequenzierreaktion möglich (OLIVEIRA 2001). Während die Fc-Bindungsregion aus fünf stabilen 160bp Repeats zusammengesetzt ist, variiert die Anzahl der 24bp Repeats der Region X (FRENAY 1996). Diese Vielfalt der Region X kommt durch Duplikation, Deletionen und Punktmutationen der Repeats zustande. Somit bietet die hoch polymorphe Struktur der Region X des Protein A und die damit verbundene Variabilität der Repeats die Möglichkeit der Differenzierung einzelner MRSA Stämme (SHOPSIN 1999). Das durch eine PCR amplifizierte *spa*-Genprodukt, mit einer Länge von ~350bp, wird in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Die Repeats, denen jeweils ein alphanumerischer Code zugeteilt ist, werden ermittelt. Aus der Variation der verschiedenen Repeats und der unterschiedlichen Anzahl dieser wird ein Repeatprofil erstellt und der *spa*-Typ ermittelt. Der Datenaustausch zwischen Laboren und über das Internet ist leicht möglich. Eine Datenbank über die bisher identifizierten Typen, ihr Vorkommen und das Repeatprofil ist im Internet vorhanden, <http://www.ridom.de/spaserver/> (HARMSEN 2003). Ein weiteres Beispiel für eine Single Locus Sequenz Typisierung bei der Beobachtung der Epidemiologie von MRSA ist die der Repeatregion, die das Koagulasegen *coa*-Gen determiniert (SHOPSIN 2000).

## 2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde folgende Fragestellung untersucht:

Für die Typisierung von MRSA-Stämmen gilt die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) immer noch als Goldstandard. Diese wird allerdings als sehr zeit-, arbeits- und kostenintensiv beschrieben. Mit der PFGE sollte eine Single Locus Sequenz Typisierung, die *spa*-Typisierung, als neue vielversprechende Methode zur Typisierung verglichen werden. In diesem Vergleich stand die Höhe der Diskriminierungsrate im Vordergrund, um die Rechtfertigung der Vorrangstellung des Goldstandards zu prüfen.

Des Weiteren sollten andere Methoden zur Identifizierung und Diskriminierung von MRSA-Stämmen beurteilt werden.

Neben dem Methodenvergleich sollten Einblicke in die räumliche und zeitliche Verbreitung von MRSA-Infektionen in einem Universitätskrankenhaus der Maximalversorgung gewonnen werden. Hierbei sollte untersucht werden, ob die *spa*-Typisierung eine geeignete Methode zur Aufdeckung krankenhausspezifischer MRSA-Muster und Übertragungswege bzw. Infektionsketten darstellt. Im Anschluss an die Aufdeckung solcher Muster und Wege sollten ggf. erwachsende Konsequenzen für die Isolierung von Patienten diskutiert werden.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Patienten und Studiendesign**

In einem Zeitraum von zwei Jahren (März 2001 bis Mai 2003) wurden MRSA-Stämme von 290 stationären Patienten der Universitätsklinik Marburg isoliert. Die Proben wurden unterschiedlichen Körperregionen und Sekreten entnommen. Dabei fiel eine unerwartet hohe Zahl an Isolat aus Stuhl auf. Insgesamt sind 70 Stämme aus Stuhl isoliert worden das entspricht 24,1%. Bei 38 Isolat (13,1%) war der MRSA-Nachweis im Stuhl die Erstidentifikation der Besiedlung. Der Vektor der gastrointestinalen Übertragung ist bis dato weitgehend unbekannt. In den meisten Richtlinien zur Infektionsprävention findet der gastrointestinale Übertragungsweg wie z.B. über Bett- und Schlafwäsche, Handtücher oder Essgeschirr keine gesonderte Bedeutung (KLOTZ et al. 2005). Von der Annahme der Existenz eines bedeutsamen gastrointestinalen Infektionsweges von MRSA ausgehend, diente eine Sammlung von MRSA-Isolat aus Stuhl als Grundlage des Methodenvergleichs zwischen der PFGE und der *spa*-Typisierung. Bei 131 Proben der 290 Patienten wurde mehr als eine Probe entnommen. Diese stammten aus dem Respirationstrakt, Wund- und Hautabstrichen, Urin, Blutkulturen, Liquorpunktaten, Kathetern und Stuhl. Von den 131 Patienten konnte bei 49 Patienten sowohl MRSA aus Stuhl als auch aus einer Probe des Respirationstraktes oder anderen Körpersekreten isoliert werden. Bei 12 Patienten war nur die Stuhlprobe positiv auf MRSA und bei den übrigen 70 Patienten war kein Nachweis von MRSA aus Stuhl möglich, sondern nur aus den weiteren Körpersekreten. Insgesamt ergab sich eine Sammlung von 61 MRSA-Isolat, die aus Stuhl gewonnen werden konnten.

#### **3.2. Bakterienstämme und Kulturmedium**

Die *S. aureus*-Stämme wurden auf 5% Schafblutagar und Mannit-Kochsalzagar mit 7,5% NaCl (von Becton & Dickinson, Heidelberg) kultiviert und bei 36°C für 24 Stunden inkubiert. Die Identifizierung von *S. aureus* wurde mit Hilfe des MicroScan® Walk Away 96 Gerätes (Dade Behring, USA) durchgeführt. Hierbei wurden die Kolonien in eine Suspension mit Aqua dest. gebracht, in vorgefertigte Mikrotiterplatten pipettiert und für 24h in den Walk Away 96 gestellt. Die anschließende Auswertung lieferte Antibiotikaresistenzen und eine Identifizierung des Bakterienstamms.





-Filtertips, Eppendorf

### **Aufreinigungsvorgang**

Die gesamte genomische DNA wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits für DNA Aufreinigung isoliert und aufgereinigt.

*S. aureus* wurde auf Columbia-Blutagar bei 36°C für 24h kultiviert, 2-3 Kolonien in 180µl ATL Puffer eingerührt und 20µl Proteinkinase K hinzugefügt. Die Suspension wurde für 15sec kräftig durchmischt und bei 56°C für ca. 1-3h im Thermomixer compact inkubiert. Nach jeder Inkubation und jedem Durchmischungsvorgang wurde das Eppendorfgefäß immer kurz anzentrifugiert, um Tropfen, die sich an der Deckelinnenseite gesammelt haben, wieder mit dem Gemisch zu vereinigen. Jede Zugabe von Substanzen, wie z.B. Puffer, erforderte einen kräftigen Vortexvorgang, um eine homogene Lösung und so eine effektive Durchführung der nächsten Schritte zu erhalten. 200µl AL Puffer wurden hinzugefügt, es folgte eine Inkubation von 10min bei 70°C mit anschließender Zugabe von 200µl Ethanol (96-100%). Als nächstes wurde das gesamte Gemisch in ein Spin Column, das wiederum in ein 2ml Sammelgefäß gestellt worden war, überführt und verschlossen. Nach der einminütigen Zentrifugation bei 6000g (8000 rpm) wurde das Spin Column in ein neues, sauberes Sammelgefäß gesetzt und das Filtrat mitsamt dem Gefäß verworfen. In das Spin Column wurde nun 500µl AW 1 Puffer pipettiert und der Zentrifugationsvorgang wiederholt, einschließlich des Ersetzens des Sammelgefäßes. Erneut wurde in das Spin Column nun 500µl AW 2 Puffer pipettiert und bei 20000g (14000rpm) für 3min zentrifugiert. Auch dieses Sammelgefäß wurde inklusive des Filtrats verworfen, das Spin Column in ein 1,5ml Eppendorf Cup gestellt und 200µl Aqua dest. hinein pipettiert. Es schloss sich eine Inkubation bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation bei 6000g (8000rpm) von je einer Minute an. Diese letzte Spülung wurde noch einmal wiederholt. Das gewonnene Filtrat enthielt die aufgereinigte DNA.

### **3.4. DNA-Amplifikation und Polymerasekettenreaktion**

Chemikalien und Lösungen:

- TAE Puffer
- c-Ethidiumbromid (EtBr)
- 100bp DNA Ladder, Fermentas
- 6x Loading Dye, Fermentas
- Aqua Dest., Braun

|                |  |
|----------------|--|
|                | -dNTP, Sigma   |
|                | -Master Taq Kit, Eppendorf                               |
| Laborgeräte;   | -Mastercycler, Eppendorf                                 |
|                | -Powerstation 200, Labnet                                |
|                | -Gel Dokumentations-System, Herolab                      |
|                | -Eppendorf research Pipetten                             |
| Einmalartikel: | -Eppendorf-Cups 1,5ml                                    |
|                | -0,2ml PCR Tubes, Eppendorf                              |
|                | -Filtertips, Eppendorf                                   |
| Primer:        | -spa-1113f (5`.-TAA AGA CGA TCC TTC GGT<br>GAG C-3`)     |
|                | -spa 1496r (5`-TTT GCT TTT GCA ATG TCA TTT<br>ACT G- 3`) |
|                | beide aus: GenBank accession no. J01786;                 |
|                | -spa1113f[1092-1113 ]& spa-1496r[1520-1496]              |

### DNA Amplifikationsvorgang (PCR)

Für die Amplifikation der *spa*-Repeat Region des Protein A der Staphylokokken wurde eine PCR mit einem Einsatz von 100ng der aufgereinigten DNA durchgeführt. Die Primer wurden mit einer Konzentration von 10pmol eingesetzt. Für den Mastermix wurden des Weiteren 200µM desoxynukleoside Triphosphate (dNTP), 5µl des 10-fach konzentrierten PCR Puffers und 1,25U Taq Polymerase benutzt. Der Cyclingvorgang bestand aus einer initialen Denaturierung von 5min bei 80°C und 35 Zyklen aus einer Denaturierung von 45sec bei 94°C, einem Annealing von 45sec bei 60°C und einer Extension von 90sec bei 72°C. Abschließend folgte eine einzelne finale Extension von 10min bei 72°C. Die Proben wurden in ein 2%iges Agarosegel pipettiert und liefen in der Gelkammer für 45-60min bei 98V. Anschließendes Ethyliumbromidbad diente zur Färbung des Gels, ein folgendes Wasserbad zur Entfärbung trägt zur Erhöhung der Kontraste bei. Unter UV-Licht konnte der Nachweis der Bande bei ca. 350bp für das korrekt entstandene PCR Produkt erbracht werden (Abbildung 7.2-1).

### 3.5. DNA-Sequenzierung

|                           |                                 |
|---------------------------|---------------------------------|
| Chemikalien und Lösungen: | -Aqua Dest., Braun              |
|                           | -TSR Puffer, Applied Biosystems |

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Molekulargenetische Kits: | -DyeEx 2.0 Spin Kit; QIAGEN; Hilden/ Germany<br>-ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle   |
| Sequencing Kit;           | -Applied Biosystems, USA  |
| Laborgeräte:              | -Mastercycler, Eppendorf<br>-310 Genetic Analyser, Applied Biosystems<br>-Zentrifuge 5415D, Eppendorf<br>-Thermomixer compact, Eppendorf<br>-Eppendorf research Pipetten  |
| Einmalartikel:            | -Microcon® YM 100, centrifugal Devices;<br>Millipore, USA<br>-Eppendorf-Cups 1,5ml<br>-0,2ml PCR Tubes, Eppendorf<br>-Genetic Analyser 0,5ml sample tubes, Applied Biosystems<br>-Genetic Analyser Septa for 0,5ml sample tubes, Applied Biosystems |
| Primer:                   | -spa-1113f (5`.-TAA AGA CGA TCC TTC GGT<br>GAG C-3`)<br>-spa 1496r (5`-TTT GCT TTT GCA ATG TCA TTT<br>ACT G- 3`)<br>beide aus: GenBank accession no. J01786;<br>-spa1113f[1092-1113]<br>-spa-1496r[1520-1496]                                       |

### **Herstellung der Proben**

Um das PCR Produkt von überschüssigen Substanzen aus der vorausgegangenen PCR zu befreien, wurde es noch einmal aufgereinigt. Dazu wurden Microcon Filter benutzt. Die Filter wurden auf die mitgelieferten Cups gesetzt, 500µl Aqua dest. hinein pipettiert und bei 2000rpm für 6min zentrifugiert. Auf den Filter wurden nun 400µl Aqua dest. und 20µl des PCR Produktes pipettiert und 15min bei 2000rpm zentrifugiert. Zum Ausspülen des im Filter aufgefangenen Produktes wurde dieser nun mit der weißen Unterseite nach oben auf ein neues Cup gesetzt, 25µl Aqua dest. hinzu pipettiert und bei 5000rpm für 3min zentrifugiert. Das gewonnene Filtrat enthielt das aufgereinigte PCR Produkt. Es folgte der Ansatz für die PCR der Sequenzierreaktion. Dazu wurden

in zwei PCR Tubes je 2µl des Filtrats pipettiert. Dazugegeben wurden des Weiteren 2µl Aqua dest., 4µl BigDye® Reagenz und 2µl Primer. Die Primer, aufgeteilt nach Forward- und Reverseaktivität, wurden jeweils in je eines der PCR Tubes in der Konzentration von 10 pmol gegeben. Es wurden dieselben Primer der DNA Amplifikation verwendet. Auch die folgende two-step PCR wurde auf zwei verschiedene Mastercycler jeweils für die Forward- bzw. Reversereaktion aufgeteilt, da zur Optimierung des Vorgangs unterschiedliche Annealingtemperaturen benutzt wurden. Sie bestand aus 25 Zyklen mit einer Denaturierung von 10sec bei einer Temperatur von 96°C und einem Annealing mit einer Temperatur von 60°C für die Forwardreaktion bzw. 56°C für die Reversereaktion für 4min. Nach dieser PCR folgte eine Entfernung der Dye Terminatoren des Produktes. Hierzu wurde das DyeEx 2.0 Spin Kit verwendet. Die Spin Columns des Kits wurden gevortext und geöffnet, in die dazugehörigen Sammelgefäße gesetzt und bei 3000rpm für 3min zentrifugiert. Die Spin Columns wurden anschließend in 1,5ml Eppendorf Cups überführt und 10µl des PCR Produktes darauf pipettiert. In weiterhin jeweils separate Behandlung für die Forward- bzw. Reversereaktion wurden die Cups bei 3000rpm 3min zentrifugiert. Zusammen mit 20µl TSR Puffer wurden 5µl des Filtrats in ein Sequenzier Tube überführt und mit entsprechenden Deckeln verschlossen. Bevor die Proben in den Sequenzer gestellt wurden, kamen sie für 2min bei 90°C in den Heizblock, um eine letzte Denaturierung durchzuführen.

### 3.6. Pulsfeldgelelektrophorese

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Chemikalien und Lösungen:  | <ul style="list-style-type: none"><li>-BHI-Medium</li><li>-Agarose für Laufgel (Pulse Field Certified Agarose, Biorad, Richmond USA)</li><li>-Lysostaphin (566U/mg solid, Sigma)</li><li>-Lysozym (from chicken egg Sigma)</li><li>-<i>Sma</i>- Restriktionsendonuklease (MBI Fermentas):<br/>Schnittstelle 5'-CCC/GGG-3'</li><li>-Lambda Ladder PFG Marker (Biolabs)</li></ul> |
| TEN-Puffer:                | <ul style="list-style-type: none"><li>-0,1M Tris-HCL (Sigma, St.Louis USA) pH 7,5</li><li>-0,1M EDTA (di-NA-Salz, Sigma)</li><li>-0,15M NaCl (Roth, Karlsruhe)</li></ul>  |
| EC-Puffer:                 | <ul style="list-style-type: none"><li>-6mM Tris-HCL pH 7,5, (1M )(Sigma)</li><li>-0,1M EDTA pH 7,5, (0,5M)</li><li>-1M NaCl</li><li>-1% Na-N-laurylsarcosinate (Fluka)</li><li>-0,5% Na-Desoxycholat (Na-Salze 95%, Sigma)</li></ul>  |
| Lyse-Puffer:               | <ul style="list-style-type: none"><li>-50mM EDTA pH7,5, (0,5M)</li><li>-1% Na-Lauryl-Sarcosin</li><li>-2mg/ml Proteinkinase K (Sigma)</li><li>-50mM Tris-HCL pH 7,5, (1M)</li></ul>   |
| TE-Puffer:                 | <ul style="list-style-type: none"><li>-10mM Tris-HCL (1M)</li><li>-5mM EDTA pH 7,5, (0,5M)</li></ul>  |
| Stopp-Puffer:              | <ul style="list-style-type: none"><li>-0,25% Bromphenolblau (Sigma)</li><li>-0,1% SDS (Sigma)</li></ul>   |
| Arbeitspuffer <i>Sma</i> : | <ul style="list-style-type: none"><li>-20mM Tris-Acetat pH 7,9 (Sigma)</li><li>-10 mM Magnesium-Acetat (Merck)</li><li>-50mM Kalium-Acetat (Sigma)</li><li>-1mM Dithiothreitol (Sigma)</li></ul>  |

|                     |   |
|---------------------|---|
| TBE-Puffer:         | -45mM Tris-HCL pH 7,5, (1M)<br>-45mM Borsäure (Sigma)<br>-1mM EDTA pH 7,5, (0,5M)   |
| LGT-Agarose-Puffer: | -10mM Tris-HCL pH 7,5, (1M)<br>-10mM Magnesium-Chlorid (Hexahydrat, Sigma)<br>-0,1mM EDTA pH 7,5, (0,5M)<br>-2% Agarose   |
| Laborgeräte:        | -Zentrifuge 5415D, Eppendorf<br>-Gyrotory Shaker Model G2, New Brunswick<br>Scientific, Switzerland<br>-Photometer, Eppendorf<br>-Thermometer compact, Eppendorf<br>-Chef-DR III System, BioRad |

### **Probenmaterial**

Von 61 Stuhl-Isolaten konnten 47 in der Pulsfeldgelelektrophorese verwendet werden. Patienten, die Symptome einer schwerwiegenden MRSA-Infektion gezeigt haben, wie z.B. Sepsis, Meningitis oder Infektionen einer totalen Endoprothese, wurde zusätzlich eine Probe aus dem Infektionsherd entnommen und für die PFGE benutzt. Des Weiteren wurden 8 deutsche epidemische MRSA-Referenzstämme (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. W. Witte, vom „NRZ für Staphylokokken“ des Robert Koch-Instituts, Werningerode, Deutschland) getestet.

### **Herstellung der Proben**

Kulturröhrchen mit 9ml BHi und ca. 6 Kolonien wurden zu einer frischen Übernacht-Kultur angeimpft. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler. Die Kulturröhrchen wurden bei 1000g für 10min zentrifugiert, das Pellet dreimal in TEN-Puffer gewaschen und mit 600µl EC-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde 600µl 2%ige Agarose (low gelling, in LGT-Agarose-Puffer) mit einer Temperatur von ca. 50°C hinzugegeben. Die Suspension wurde durchmischt und in Kunststoff-Einwegformen von Biorad pipettiert. Nach dem Erkalten bei 4°C für 10-30min entstanden so Agaroseblöckchen mit Bakterienzellen einer definierten Menge, die nun in TE-Puffer

gelagert werden konnten. Die Verfestigung in Agarose erhöht die mechanische Belastbarkeit der großen DNA-Moleküle beim Aufschluss der *S. aureus* Zellen und der Denaturierung von überschüssigen Proteinen, wie z.B DNAsen. Der Aufschluss erfolgte in Eppendorf-Cups, die pro Blöckchen mit 1ml EC-Puffer, 10mg/ml Lysozym, 45U/ml Lysostaphin versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Blöckchen erst mit sterilem Aqua dest., dann mit Lyse-Puffer gewaschen. Je 1ml Lyse-Puffer mit 1mg/ml Proteinase K pro Blöckchen wurde zupipettiert und für 48h in einem Heizblock mit Schüttelfunktion bei 55°C inkubiert. Nach 12-24h wurde der Puffer gewechselt. Das Enzym Proteinase K wurde durch mehrere Waschschriffe aus den Blöckchen entfernt. Dies erfolgte durch eine Lagerung in TE-Puffer und eine Inkubation für 48h bei Raumtemperatur unter Bewegung. Während dieser Zeit wurde der Puffer dreimal gewechselt, um alle Reste von Proteinasen zu beseitigen. Die in den Agaroseblöckchen für Enzyme frei zugängliche DNA konnte nun geschnitten werden. Die Blöckchen wurden zunächst für 48h vorgepuffert. Dazu wurden sie mit 0,5ml Arbeitspuffer für *Sma*I versetzt und bei 4°C gehalten. Der Puffer wurde nach 24h gewechselt. Nach dem Vorpuffern schloss sich die Fragmentierung der DNA mit 20U *Sma*I in 0,25ml Arbeitspuffer pro Blöckchen an. Nach 18-24h Inkubation bei 25°C wurde die Verdauung mit 50µl Stopp-Puffer pro Blöckchen unterbrochen. Es folgte eine Vorkalibrierung der Blöckchen bei 4°C für 24h in TBE-Puffer, um ihre Salzkonzentration an die des Laufpuffers anzupassen. Ein 1%iges Agarosegel wurde in eine entsprechende Gelform mit einem Kamm gegossen. Nach Verfestigung und Entfernung des Kammes wurden in die entstandenen Vertiefungen die Blöckchen eingesetzt und mit 1%iger Low-gelling Agarose verschlossen. Das Gelkammersystem für die PFGE wurde folgendermaßen eingestellt: eine Laufzeit von 30h mit einer Temperatur von 14°C, bei einer Spannung von 6,0V/cm mit einem linearem Anstieg und einem initialen Impuls von 5sec und abschließend 30sec mit bei 120° fixierten Winkeln. Bakteriophagenmarker  $\lambda$  DNA Verkettungen wurden hinzugegeben, um die Größe der DNA Fragmente schätzen zu können. Anschließend wurde das Gel in Ethidiumbromid gefärbt, die Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Gel Dokumentationssystem festgehalten (Abbildung 7.2-9). Ein Dendogramm wurde mit dem Gelscan aufgezeichnet (Abbildung 7.2-7 und 8).

### **3.7. *spa*-Typisierung**

Die *spa*-Typen wurde mit Hilfe der Ridom StaphType Software (Ridom GmbH, Würzburg) bestimmt. Hierbei wurden die Sequenzerdaten (Abbildung 7.2-2 bis 5) in das Programm eingegeben, die Repeats der *spa*-Region identifiziert und der *spa*-Typ

zugeordnet (Abbildung 7.2-6). Das Ergebnis des zugeordneten *spa*-Typen wurde anschließend in einer Datenbank abgespeichert und durch epidemiologisch wichtige Zusatzinformationen wie Station und Datum der Probenentnahme ergänzt.



## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Probenmaterial**

Von März 2001 bis Mai 2003 wurden bei 290 stationären Patienten der Universitätsklinik Marburg MRSA nachgewiesen. Unerwartet hoch war die Zahl der MRSA-Isolate aus Stuhl: 70 von 290, das entspricht 24,1%. Bei 38 Isolaten war dies die Erstidentifikation, bevor der Keim in anderen Proben festgestellt wurde. Bei 131 der 290 Patienten wurden sowohl Proben entweder aus dem Respirationstrakt, Wund- und Hautabstrichen, Blutkulturen, Aspirat, Kathetern, Urin, Liquor als auch zusätzlich aus Stuhl entnommen. Bei diesen Patienten konnte in mindestens einer Probe MRSA nachgewiesen werden. Bei 49 dieser 131 Patienten gelang es MRSA im Stuhl und in einer weiteren Probe nachzuweisen. Bei 12 Patienten war allein die Stuhlprobe positiv auf MRSA und bei 70 Patienten war kein Nachweis aus Stuhl zu gewinnen, jedoch aus dem Respirationstrakt oder einem anderen Körpersekret. So konnte bei insgesamt 61 der 131 Patienten MRSA aus Stuhl isoliert werden.

### **4.2. *spa*-Typisierung**

Bei 47 der 61 Isolate aus Stuhl wurde eine *spa*-Typisierung vorgenommen. 14 Proben waren von zu schlechter Qualität und konnten nicht in die Sequenzierreaktion eingesetzt werden. Gleiche *spa*-Typen wurden in Gruppen zusammengefasst und nach Häufigkeiten sortiert. Dabei wurden neun verschiedene *spa*-Typen identifiziert, wobei der Haupttyp der *spa*-Typ t003 war. 25 der 47 Proben konnten diesem Typ zugeordnet werden. Es fanden sich weitere Gruppen, denen ein *spa*-Typ zugewiesen werden konnte. Dem *spa*-Typ t001 konnten zehn Proben, t032 vier Proben, t004 drei Proben zugeordnet werden. Allerdings wurden auch fünf singuläre *spa*-Typen identifiziert (Tabelle 7.1-1).

Von sechs Patienten wurden zusätzlich zu den Stuhlisolaten insgesamt zehn Proben aus Abstrichen anderer Körperregionen und Sekreten isoliert und typisiert. Vier dieser Patienten wurde ebenfalls der Haupttyp der Untersuchung, der *spa*-Typ t003 identifiziert, den beiden anderen Patienten konnte jeweils ein *spa*-Typ zugeordnet werden, t001 und t032 (Tabelle 7.1-5).

Zusätzlich wurden als Referenz acht deutsche MRSA-Epidemiestämme aus der Sammlung des Robert Koch-Instituts (Wernigerode) *spa*-Gen typisiert, der

„Süddeutscher“-, „Berliner“-, „Rhein-Hessen“-, „Wiener“-, „Norddeutscher“-, „Hannoveraner“-, „Süd-Ostdeutscher“- und „Barnim“-Stamm. Bei allen Stämmen konnte ein *spa*-Typ zugeordnet werden. Die Ergebnisse wurden verglichen und entsprachen den Daten der Datenbank des *spa*-Servers (<http://www.ridom.de/spaserver/mlst.shtml>) (Tabelle 7.1-6). Der Haupttyp in der vorliegenden Untersuchung, *spa*-Typ t003, entsprach zwar keinem dieser Referenzstämme, konnte aber als Subklon des „Rhein-Hessen“-Epidemiostamms identifiziert werden. Der „Rhein-Hessen“-Epidemiostamm aus der Sammlung wurde als *spa*-Typ t002 identifiziert, der sich als Prototyp dieses Epidemiostammes kennzeichnen ließ.

### 4.3. PFGE

Insgesamt konnten 58 der 61 aus Stuhl isolierten Proben in der PFGE eingesetzt werden. Von drei Proben konnte aus labortechnischen Gründen keine PFGE erfolgen. Unter den 47 Proben die auch in der *spa*-typisiert wurden, konnten neun PFGE-Typen identifiziert werden. Zusammengefasst zu einem Typ wurden sie, wenn sie sich in ihrem Muster in drei oder weniger Banden unterschieden (TENOVER 1995). So konnte zwischen einem Hauptklon und acht einzelnen Klonen differenziert werden, von denen fünf Klone auch singulär vorkamen (Tabelle 7.1-2).

Wie auch in der *spa*-Typisierung wurden als Referenz acht deutsche MRSA-Epidemiostämme aus der Sammlung des Robert Koch-Instituts (Wernigerode) in der PFGE getestet. Der hier identifizierte Hauptklon mit dem PFGE-Muster 1 war identisch mit dem PFGE-Muster des „Rhein-Hessen“-Epidemiostamms. Die anderen PFGE-Muster der Epidemiostämme ließen sich keinem identifizierten Klon der Untersuchung zuordnen (Abbildung 7.2-8).

Des Weiteren wurden von sechs Patienten Proben aus anderen Körperregionen und Sekreten in der PFGE untersucht, die ebenfalls in der *spa*-Typisierung analysiert wurden. Hierbei konnten den Proben eines einzelnen Patienten jeweils ein einheitliches PFGE-Muster zugeordnet werden. Bei vier Patienten war das PFGE-Muster identisch mit dem des Hauptklons, die beiden anderen Patienten wiesen jeweils ein anderes PFGE-Muster auf (Tabelle 7.1-5, Abbildung 7.2-9).

#### 4.4. Methodenvergleich

47 Isolate aus Stuhl wurden sowohl in der *spa*-Typisierung und in der Pulsfeldgelelektrophorese untersucht. Dabei konnten mit jeder Methode je neun *spa*-Typen bzw. neun PFGE-Muster ermittelt werden. In der *spa*-Typisierung waren dem Haupttyp 25 Proben zuzuordnen. Während den *spa*-Typen t001 zehn Proben, bzw. t032 vier Proben, bzw. t004 drei Proben angehörten, konnten fünf Proben jeweils nur einem Typ zugeordnet werden (t002, t030, t189, t294, t432) (Tabelle 7.1-1).

Auch in der PFGE konnten fünf singuläre Muster identifiziert werden (PFGE3,4,5,7,8). Das Hauptmuster (PFGE1) konnte bei 26 Proben bestimmt werden (Abbildung 7.2-7). Kleinere Gruppen von PFGE-Mustern bildeten PFGE 2, dem acht Proben, PFGE 6 dem sechs Proben und PFGE 9, dem zwei Proben zugeordnet werden konnten (Tabelle 7.1-2,).

Die Gruppe, bei denen der Haupttyp der *spa*-Typisierung t003 mit 8 Repeats festgestellt wurde, deckte sich weitgehend mit denselben Proben, die auch in PFGE 1 als Hauptklon gruppiert wurden. In der PFGE waren diese Proben identisch mit dem PFGE-Muster des „Rhein-Hessen“-Epidemiestamms (Abbildung 7.2-8). Der identifizierte *spa*-Typ ordnete die Proben ebenfalls diesem Epidemiestamm zu, allerdings einem Subklon dieses Stammes. So konnte bei 24 Proben mit beiden Methoden ein übereinstimmendes Ergebnis erzielt werden.

Einige Proben des häufigsten *spa*-Typs und PFGE Musters waren allerdings nicht deckungsgleich. So stammte eine Probe mit dem *spa*-Typ t003 nicht aus der Probengruppe mit dem PFGE-Muster des Hauptklons. Hierbei handelte es sich um ein Isolat mit dem Muster PFGE 5, einem singulären Klon in der PFGE Analyse. Zwei Proben, die wiederum dem Hauptklon der PFGE 1 zugeordnet waren, hatten einen anderen *spa*-Typ (t002 mit 10 Repeats und t189 mit 6 Repeats) (Tabelle 7.1-3).

Der Gruppe mit dem *spa*-Typ t001 mit 10 Repeats wurde bei zehn Proben zugewiesen. In der PFGE konnten diesen Proben mit diesem einen *spa*-Typ vier verschiedene PFGE-Muster zugeordnet werden. Dabei hatten sechs Proben denselben PFGE-Typ (PFGE2), einem PFGE-Muster (PFGE 9) waren zwei der zehn Proben zugeordnet und bei zwei weiteren Proben zeigte sich je ein singuläres PFGE-Muster (PFGE 3 + 7) (Tabelle 7.1-3).

Zu *spa*-Typ t032 mit vier Proben konnte komplett der PFGE 6 Typ zugeordnet werden. Der *spa*-Typ t032 hatte eine Repeat-Anzahl von 16. Zwei weitere Proben hatten das Bandenmuster PFGE 6. Diesen beiden Proben wurde in der Genotypisierung je ein anderer *spa*-Typ zugeordnet. Diese fielen allerdings dadurch auf, dass beide eine ähnlich große Anzahl an Repeats besaßen, wie der *spa*-Typ t032, nämlich t294 mit 17 Repeats und t432 mit 15 Repeats (Tabellen 7.1-3 und 7.1-7).

*spa*-Typ t004 mit 9 Repeats wurde bei drei Proben identifiziert, wobei zwei Isolate sich PFGE 2 und ein Isolat PFGE 4 zuordnen lassen (Tabelle 7.1-3).

Bei einer Probe wurde sowohl in der PFGE als auch in der *spa*-Typisierung ein singulärer Klon identifiziert, nämlich *spa*-Typ t030 mit 6 Repeats bzw. PFGE 8 (Tabelle 7.1-3).

Mit beiden Methoden ließen sich jeweils neun Gruppen von Proben unterscheiden mit einem Haupttyp bzw. Hauptmuster sowie drei weitere Gruppen mit einer kleineren Anzahl von Proben als die Hauptgruppe. Bei fünf Proben wurde ein singulärer *spa*-Typ bzw. PFGE-Muster identifiziert. Dabei stimmten die gruppierten Proben der beiden Methoden zu einem großen Anteil überein (Tabelle 7.1-3).

Eine Zuordnung der durch die PFGE identifizierten Klone zu den Referenz-Epidemiestämmen war nur beim Hauptklon möglich. Alle weiteren identifizierten PFGE-Muster stimmten nicht mit den ermittelten PFGE-Mustern der Epidemiestämme überein (Abbildung 7.2-8) Beim Vergleich der *spa*-Typen der Proben mit den verschiedenen deutschen Epidemiestämmen erfolgte eine Zuordnung von 15 Proben zu vier Epidemiestämmen („Süddeutscher“/ t001 mit zehn Proben, „Berliner“/ t004 mit drei Proben, „Barnim“/ t032 mit vier Proben, „Rhein-Hessen“-Prototyp/ t002 mit einer Probe). Vier singuläre *spa*-Typen von Proben sowie der Haupttyp t003, welcher nach Abgleich mit dem „Spaserver“ im Internet als Subklon des „Rhein-Hessen“-Stamms eingeordnet wurde, konnten nicht als zugehörig zu den untersuchten acht deutschen Referenzstämmen erkannt werden (Tabelle 7.1-6).

#### **4.5. Patienten**

Von sechs Patienten wurden zusätzlich zehn Proben aus anderen Körperregionen und Sekreten *spa*-Gen typisiert und ein PFGE-Muster erstellt. Diese Patienten hatten eine manifeste MRSA-Infektion, die durch positive Blutkulturen oder Wundabstriche

bestätigt worden war. Bei allen Patienten wurde in allen Proben des einzelnen Patienten sowohl je ein gleicher *spa*-Typ als auch ein gleiches PFGE-Muster identifiziert (Tabelle 7.1-5).

Drei dieser Patienten (Patient 01, 02, 03) entwickelten eine Sepsis, Patient 04 hatte eine Endoprotheseninfektion (TEP). Bei diesen vier Patienten wurde der *spa*-Typ t003 bestimmt, dem Haupttyp der Untersuchung sowohl in der Genotypisierung als auch in der PFGE (Abbildung 7.2-9).

Bei Patient 05 mit einer durch MRSA verursachten Wundinfektion zeigte sich ebenfalls ein gleiches PFGE-Muster und ein gleicher *spa*-Typ in den Proben aus Nase, Wunde und Stuhl. Es handelte sich hierbei um den *spa*-Typ t001.

Bei Patient 06 mit einer Meningitis wurden MRSA-Isolate aus der Nase, Liquor und Stuhl gewonnen. Auch hier war ein identisches PFGE-Muster und derselbe *spa*-Typ (t032) in Nase und Stuhl vorhanden. Ein Isolat aus dem Liquor stand für die Typisierung nicht zur Verfügung (Tabelle 7.1-5).

#### **4.6. Epidemiologie**

Bei der Betrachtung des Auftretens von Ort und Zeit der MRSA-Isolate aus Stuhl konnten zeitliche Häufungen eines *spa*-Typs auf einzelnen Stationen festgestellt werden. So wurden auf einer Intensivstation innerhalb von 12 Tagen bei drei Patienten MRSA im Stuhl mit dem gleichen *spa*-Typ (t001) nachgewiesen. Allerdings konnte auch ein gehäuftes Auftreten von MRSA im Stuhl in einem zeitlichen Rahmen von wenigen Wochen unterschiedlicher *spa*-Typen auf einzelnen Stationen beobachtet werden. Auf einer Station wurden innerhalb von vier Wochen von drei Patienten MRSA aus Stuhl isoliert, bei denen zwei verschiedene Stämme nachgewiesen werden konnten (t003, t001) (Tabelle 7.1-4).

Zwei der Patienten (Patient 01, 02) mit einer manifesten MRSA-Infektion lagen bei der Behandlung zu unterschiedlichen Zeiten (Mai und Juli) auf unterschiedlichen Stationen. Jedoch wurde der gleiche *spa*-Typ (t003) identifiziert. Zuvor waren die Stühle beider Patienten im März desselben Jahres ebenfalls bei einem stationären Aufenthalt positiv auf MRSA mit demselben *spa*-Typ (t003) getestet worden. Während dieses Aufenthaltes im Krankenhaus lagen beide Patienten auf derselben Station. Bei beiden Patienten gab es anschließend an die Behandlung im März MRSA-Kontrollabstriche.

Dabei wurde jedoch von Patient 01 nur je ein einziger Abstrich von Nase, Rachen, Stirn und Stuhl genommen, in dem kein MRSA nachgewiesen wurde. Vorgeschrieben zur Bestätigung des Sanierungserfolges sind in den Empfehlungen des Robert Koch-Instituts allerdings Abstriche an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit negativem Keimnachweis auf MRSA aus Nase, Stirn, Rachen und dem betroffenen Segment, wie hier der Stuhl (KOMMISSION FÜR KRANKENHAUSHYGIENE UND INFektionsPRÄVENTION AM ROBERT KOCH-INSTITUT 2004). Bei Patient 02 wurde im letzten Kontrollabstrich noch immer MRSA auf der Haut, der Leiste, im Sputum und Stuhl nachgewiesen. Danach folgte keine Kontrolle mehr zur Bestätigung des Sanierungserfolges bis zur MRSA-bedingten Sepsis im Juli. Bei beiden Patienten wurde während der Sepsis erneut der *spa*-Typ t003 in der Blutkultur, Stuhl und Nase bzw. Urin nachgewiesen.

## 5. Diskussion

Mit den vorliegenden Ergebnissen wurden die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und die *single locus sequence* Typisierung am Beispiel der *spa*-Typisierung als Methoden zur Differenzierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen verglichen und auf ihren Stellenwert geprüft. Dabei wurden MRSA-Isolate aus dem Stuhl untersucht, die in einem Zeitraum von zwei Jahren (März 2001-Mai 2003) in den eigenen bakteriologischen und krankenhaushygienischen Laboren gesammelt wurden. Aus einer Sammlung von 61 isolierten Stämmen wurden 47 Proben sowohl in der PFGE analysiert als auch *spa*-Gen typisiert. Weiterhin wurden von sechs Patienten mit MRSA-Isolaten aus dem Stuhl, bei denen zusätzlich eine manifeste MRSA-Infektion nachgewiesen worden war, ergänzend Isolate aus anderem Probenmaterial, wie z.B. Blutkulturen, Nasen- und Wundabstrichen, Urin und Liquor mit beiden Methoden untersucht.

Proben mit dem gleichen *spa*-Typ wurden gruppiert und den Proben mit gleichem PFGE-Muster gegenübergestellt.

Sowohl in der PFGE als auch in der *spa*-Typisierung wurden zusätzlich acht deutsche MRSA-Epidemiestämme als Referenzstämme mit untersucht. Mehreren Gruppierungen um einen *spa*-Typ konnten Epidemiestämme zugeordnet werden, was jedoch nur bei einer Gruppe um ein PFGE-Muster möglich war.

In den vorgestellten Ergebnissen wurde gezeigt, dass die in der PFGE ermittelten Gruppierungen von MRSA-Stämmen die der *spa*-Typisierung weitgehend entsprachen.

Den 47 Proben, die mit beiden Methoden untersucht wurden, konnten je neun *spa*-Typen und neun PFGE-Muster zugeordnet werden. Dabei erfassten beide Methoden je fünf singuläre Typen. Jedoch deckten sich die Zuteilungen der Proben zu Gruppen durch die beiden Methoden nicht völlig.

Die Übereinstimmung der beiden Methoden zeigte sich vor allem in dem Haupttyp der Untersuchung. 24 Proben hatten sowohl denselben *spa*-Typ (t003), also auch dasselbe PFGE-Muster (PFGE1). Diesem *spa*-Typ konnte ein Subklon des „Rhein-Hessen“-Epidemiestammes und mit der Methode der PFGE der „Rhein-Hessen“-Stamm zugeordnet werden.

Zwei Gruppen von Proben, denen je ein *spa*-Typ zugeordnet wurde, konnten jeweils mehrere PFGE-Muster zugeordnet werden.

Das Beispiel dieser beiden Gruppen deutet auf eine höhere Diskriminierung der MRSA-Stämme durch die Methode der PFGE hin. In zahlreichen Studien wurde die PFGE als Methode der Wahl anderen gegenübergestellt. Dabei stand an erster Stelle immer die überlegen hohe Diskriminierung der Stämme, besonders bei der Typisierung von Subtypen. Sie gilt auch heute noch als Goldstandard (CHIOU 2000; MONTESINOS 2002; SAULNIER 1993; SHOPSIN 2001; TANG 2000).

Ein anderes Beispiel der Untersuchungsreihe zeigt genau das Gegenteil, nämlich eine höhere Diskriminierungsrate der *spa*-Typisierung. Bei sechs Proben mit nur einem PFGE-Muster wurden insgesamt drei verschiedene *spa*-Typen unterschieden. Die unterschiedlichen *spa*-Typen ähnelten sich allerdings in ihrer hohen Repeatzahl (15-17 Repeats) (Tabelle 7). Der durch die PFGE ermittelte Zusammenhang der Proben lässt Rückschlüsse auf Mutationen bei diesen ziehen, die in der PFGE noch nicht zu einer signifikanten Änderung des Bandenmusters geführt haben und somit nicht nachweisbar sind. Spontane Mutationen, wie Deletionen, Duplikationen oder Punktmutationen der polymorphen Region X, sind häufig beschrieben worden. Der hohe Polymorphismus und die große Anzahl an Variationen der Repeats des *spa*-Gens bieten überhaupt erst die Grundlage der *spa*-Typisierung (SHOPSIN 1999).

Die Ergebnisse zeigen die Gleichwertigkeit der Methoden in ihrer Diskriminierungskapazität. Untermauert wird die Äquivalenz beider Methoden noch durch die Ergebnisse der zusätzlich zu den Stuhlproben untersuchten Patientenproben. Hier konnte bei allen sechs Patienten sowohl ein einheitlicher *spa*-Typ als auch ein gleiches PFGE-Muster pro Patient nachgewiesen werden.

Um Methoden zur Typisierung von Bakterien zu charakterisieren, sollten hauptsächlich fünf Kriterien betrachtet werden. Dies sind Typisierbarkeit, Reproduzierbarkeit, Höhe der Diskriminierung, Einfachheit der Interpretation der Ergebnisse und Leichtigkeit der Durchführung der Labormethode (MASLOW 1993). Typisierbarkeit bezieht sich dabei auf die Möglichkeit, ein absolut eindeutiges Ergebnis aus jedem Isolat mit der Methode zu bekommen. Keine Typisierbarkeit ist bei Methoden mit keinem oder mehrdeutigem Ergebnis gegeben. Reproduzierbarkeit meint die Ergebnisbestätigung einer Methode,



wenn ein Stamm erneut getestet wird. Die Höhe der Diskriminierung wird vor allem durch die Möglichkeit der Methode zwischen nicht verwandten Isolaten zu unterscheiden definiert. Während einige Methoden nur große allgemeine Klassen unterscheiden, ist es anderen Methoden möglich, Isolate in kleine Gruppen mit Subgruppen einzuteilen, um epidemiologische Daten zu vervollständigen. Je mehr Erfahrung und Übung für die Interpretation der Ergebnisse und für die Durchführung der Methode im Labor benötigt wird, desto weniger Akzeptanz wird sie in den Laboren gewinnen, da diese Fähigkeiten oft nicht vorhanden sind (TENOVER 1994). Anhand dieser Kriterien sind die Stärken und Schwächen der Methoden zur Differenzierung von Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen, besonders der Pulsfeldgelelektrophorese und *spa*-Typisierung herauszustellen und zu prüfen. Die Typisierbarkeit ist bei beiden Methoden gegeben. Sowohl die *spa*-Typisierung als auch PFGE liefern Ergebnisse, die eindeutig und damit für die Untersuchung von *S. aureus* Stämmen geeignet sind. Die Reproduzierbarkeit ist bei beiden angewandten Methoden vollständig vorhanden. In einer Studie wurden dieselben Proben in verschiedenen Testreihen eingesetzt und so mehrmals in der PFGE untersucht. Dabei ergaben sich keine Abweichungen in den Ergebnissen (TENOVER 1994). Die ausreichende Stabilität der polymorphen X-Region und die damit verbundene Reproduzierbarkeit wurde lange Zeit angezweifelt. Frénay et al. testeten aus diesem Grund vier MRSA-Stämme, die bei einem Ausbruch in einem Krankenhaus isoliert worden waren. Der *spa*-Typ wurde bestimmt und die Stämme anschließend 10 Tage auf Schafblut-Agar kultiviert. Die Bestimmung des *spa*-Typs ergab keine Änderung der DNA-Sequenz zum ersten Ergebnis, die unter dieser Kultivierung zustande gekommen wäre. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die polymorphe X-Region des Protein A stabil genug ist, um einen verlässlichen *spa*-Typ zu bestimmen und verschiedene MRSA-Stämme zu differenzieren (FRENAY 1996). Diese These wird auch unterstützt durch eine Arbeit, in der eine historische Stammsammlung von Bakterien des Centers for Disease Control and Prevention (CDC), die auch 58 *S. aureus*-Isolate beinhaltete, mit verschiedenen Methoden untersucht wurde. Das Ergebnis zeigte eine Stabilität der *spa*-Typisierung, mit der eine korrekte Einteilung epidemiologisch verwandter Bakterienstämme möglich war (SHOPSIN 2001).

In der Diskriminierung beider Methoden zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung eine ausgeglichene Situation. Es konnten keine Unterschiede in der Diskriminierungsrate festgestellt werden. So gab es zahlenmäßig die gleiche Anzahl an singulären Stämmen und Gruppenbildungen, auch wenn die Isolate mit beiden

Methoden untersucht und teilweise mit leichten Abweichungen in Gruppen eingeteilt wurden. In anderen Arbeiten wurde der Typisierung des polymorphen Protein A eine niedrigere Diskriminierung zugeschrieben, obwohl die Gruppierungen, basierend auf der *spa*-Typisierung, chromosomalen Zusammenhang zeigen und zu großen Teilen mit den Hauptgruppen der PFGE übereinstimmen. Der Unterschied zwischen den beiden Methoden liegt vor allem in der Bildung von Subgruppen, die in der PFGE besonders ausgeprägt vorliegen (CHIOU 2000; HARMSSEN 2003; MONTESINOS 2002; SHOPSIN 1999; TANG 2000; WALKER 1998). Des Weiteren ist für die Diskriminierungskapazität der Methode vor allem die Herkunft und der Zeitraum des Sammelns der Isolate von Bedeutung. Die *spa*-Typisierung liefert hervorragende Ergebnisse, um die klonale Abstammung von Isolaten nachzuvollziehen, da z.B. Punktmutationen zu Rasterverschiebungen und einer Änderung der Repeatreihenfolge führen, die präzise nachvollzogen werden können und so Abstammungsbeurteilungen möglich sind. Somit ist diese Methode für lokal begrenzte und in einer kurzen Zeitperiode gesammelte Isolate, eine Situation wie sie bei einer Ausbruchuntersuchung anzutreffen ist, besonders geeignet. Für globale Studien mit einer Sammlung von MRSA-Isolaten über einen langen Zeitraum wird allerdings eine Ergänzung mit anderen Methoden zur Diskriminierung empfohlen (OLIVEIRA 2001).

Die Einfachheit der Interpretation der Ergebnisse und Leichtigkeit der Durchführung der Labormethode können als ein Punkt der Charakterisierung der Methoden diskutiert werden. Die PFGE ist eine sehr langsame und zeitintensive Methode, die viel Erfahrung und geschultes Personal für die komplizierten Laborschritte benötigt. Dabei ist nach einem strikten Protokoll vorzugehen (MONTESINOS 2002). Wie auch andere Methoden zur Typisierung, die auf der Beurteilung von Bandenmustern in Agarosegel beruhen, ist auch die Interpretation des PFGE-Ergebnisses oft subjektiv (TENOVER 1994). Mittlerweile sind viele verschiedene Protokolle im Umlauf, die im Laufe der Erfahrungen von unterschiedlichen Laboren entstanden sind. Um Vergleichsdaten zu erlangen und für die Einrichtung einer Datenbank ist die Standardisierung des PFGE-Protokolls von großer Bedeutung (MURCHAN 2003). Im Gegensatz dazu ist die *spa*-Typisierung schnell und einfach zu handhaben. Für die Etablierung im Labor werden lediglich einige Erfahrungen mit PCR-basierender Sequenzieretechnik benötigt, welche durch die große Anzahl an modernen Laborkits leicht erlangt werden können. Für die technische Durchführung werden ein Thermocycler und ein Sequencer benötigt (OLIVEIRA 2001). Die Ergebnisse sind eindeutig und können objektiv verglichen werden. Durch die Eingabe oder das Abgleichen der Ergebnisse mit Datenbanken

sind lokale und globale epidemiologische Studien möglich. Ebenfalls durch elektronische Datenübertragung ist der Austausch zwischen Laboren um ein Vielfaches erleichtert (SHOPSIN 2001).

Auch andere Methoden zur Differenzierung von *S. aureus* können den Kriterien von Maslow et al. unterzogen werden, um sie zu charakterisieren. Über die Jahre wurden verschiedene Methoden etabliert. Die Phagenlysotopie war eine der ersten Techniken und unterschied die Isolate durch phänotypische Marker. Sie ist heute durch DNA-basierende Methoden ersetzt und kann als historisch angesehen werden. In Untersuchungen wird berichtet, dass für die Phagentypisierung teilweise keine Ergebnisse zustande kamen. Die Typisierbarkeit und ebenfalls auch die Reproduzierbarkeit ist damit nicht konstant gegeben (TENOVER 1994). Zusätzlich ist die Diskriminierungsrate sehr niedrig und der labortechnische Aufwand groß. Die Phagenlysotopie hält den Kriterien von Maslow nicht stand und ist somit keine geeignete Methode zur Differenzierung von *S. aureus*.

Eine weitere genotypisierende Methode neben der PFGE und der *single locus sequence*-Typisierung, hier am Beispiel von Protein A, ist die Multi Locus Sequenz Typisierung (MLST). Sie liefert eindeutige, wiederholbare Ergebnisse, ist damit für eine Typisierung geeignet und besitzt eine stabile Reproduktivität. Die Diskriminierung dieses Verfahrens ist hoch. Auch hier lassen sich, wie bei der *spa*-Typisierung, die Ergebnisse zwischen Laboren per elektronischem Datenaustausch übermitteln. Weiterhin besteht die Möglichkeit des Vergleichs der Ergebnisse mit anderen Studien über Datenbanken im Internet (ENRIGHT 2000). Bei der MLST werden allerdings sieben sogenannte „house keeping“-Gene typisiert, wodurch sie im Vergleich von mehr als 2500bp je Isolat sehr laborintensiv und zeitaufwendig ist. Für neue, kürzlich aufgetretene Subgruppen, wie dies bei *S. aureus* häufig vorkommt, ist die Variabilität der „house keeping“-Gene wahrscheinlich gering und damit ist eine niedrigere Diskriminierungsrate zu erwarten, als bei Genen mit einer hohen Variabilität. Des Weiteren verursacht MLST auch höhere Kosten, als sie bei der Typisierung eines einzelnen Gens, wie bei der Single Locus Sequenz Typisierung anfallen.

Zur Zeit- und Kostenersparnis gilt es, ein einzelnes Gen zu finden, das polymorph genug ist, um bei der Sequenzierung dieses Gens eine erfolgreiche Stammdifferenzierung durchzuführen. Diese Variabilität ist besonders bei Genen mit *short sequence repeat* (SSR) Regionen gegeben. Drei solcher Gene sind bei *S. aureus*

bekannt, das Protein A-Gen (*spa*), das Koagulase-Gen (*coa*) (SHOPSIN 2000) und das *clumping factor* B-Gen (*clfB*) (HARMSEN 2005). Bei den SSR-Regionen kommen Punktmutationen und intragenetische Rekombinationen aufgrund von Fehlpaarungen während der Replikation vor mit dem Ergebnis eines hohen Polymorphismus. Dadurch lässt sich vor allem bei der *spa*-Typisierung eine höhere Diskriminierung als bei der MLST vermuten (HARMSEN 2003). Das *coa*-Gen besitzt zwar mehr Repeat-Motive als das *spa*-Gen, ist allerdings weniger polymorph als dieses und zeigt eine geringere Diskriminierungsrate in der Typisierung als das *spa*-Gen oder die PFGE. Allerdings liefert die Kombination aus *spa*- und *coa*-Typisierung sehr gute Ergebnisse (CHIOU 2000). Dabei kann die *spa*-Typisierung verbessert werden in ihren Ergebnissen der Diskriminierung, da teilweise Stammabstammung oder klonale Beziehungen unter den Stämmen zu wenig Variation in der Organisation des Protein A zeigen und diese so hervorgehoben werden können (SHOPSIN 2000). Das *clfB*-Gen ist in seiner Diskriminierungsrate den beiden anderen Methoden unterlegen. Daher kommt es weder als eigenständige Methode noch als ergänzende Methode zur Erhöhung der Diskriminierung in der Differenzierung von *S. aureus* in Frage. Die Typisierung des *clfB*-Gens bietet keine Vorteile gegenüber den anderen beiden *single locus sequence*-Typisierungen (HARMSEN 2005). Zudem sind die beiden anderen *single locus sequence*-Typisierungen, *spa*-Gen und *coa*-Gen, deutlich günstiger als die PFGE oder MLST.

Ein enormer Vorteil der genomentschlüsselnden Methoden wie MLST oder *spa*-Typisierung ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit Datenbanken im Internet. Besonders etabliert ist die länger existierende Methode MLST. Die Ausbreitung der *spa*-Typisierung entwickelt sich nicht so schnell zu einem beweglichen und übertragbaren Instrument der MRSA-Differenzierung, da sie vor allem durch das Fehlen von generell verfügbarer Software für die Analyse der Sequenzen behindert wird. Die Repeatidentifikation bzw. *spa*-Typ-Identifikation und das Abstimmen neu gefundener *spa*-Repeats bzw. Typen mit der Datenbank ist dadurch erheblich erschwert (HARMSEN 2003).

In der vorliegenden Arbeit ist eine neue Software zum Einsatz gekommen, RidomStaph®, die genau diese Probleme behebt. Die Software erlaubt eine automatische Repeat-Erkennung anhand von Chromatogrammen aus der DNA-Sequenzierung. Es wurde eine neue numerische Nomenklatur entwickelt, sodass jede Repeatsequenz ihren eigenen *spa*-Typ zugeordnet bekommt. Die erfassten Daten

können mit der Datenbank ([www.ridom.de](http://www.ridom.de)) im Internet synchronisiert werden, damit internationale Datenbanken aufgebaut werden können. Dieses Vorgehen orientiert sich an dem erfolgreichen Vorbild der MLST-Datenbank ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)) und erweist sich als hochgradig „portabel“ (VOGEL 2005). Sie ist Grundlage für ein modernes, auf dem Internet basierendes Management der genotypisierten Daten von MRSA-Bakterien.

Weltweit ist die Inzidenz von MRSA steigend. Dabei sind die therapeutischen Optionen einer MRSA-Infektion weitaus geringer, der Aufenthalt im Krankenhaus länger und die Kosten der Behandlung deutlich höher, als bei Infektionen mit einem Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA). Außerdem geht die Infektion mit MRSA mit einem signifikant erhöhten Mortalitätsrisiko einher. Um das Mortalitätsrisiko von nosokomialen Infektionen abschätzen zu können, sind in einer Meta-Analyse Studien verglichen worden, in denen wiederum MRSA- und MSSA-induzierte Sepsis verglichen wurden. Eindeutiges Ergebnis der Meta-Analyse war ein erhöhtes Mortalitätsrisiko einer MRSA bedingten Sepsis (WHITBY 2001). Ebenfalls von einem erhöhten 90-Tage Mortalitätsrisiko bei Infektionen mit MRSA von chirurgischen Wunden im Vergleich zu MSSA bedingten Infektionen berichtet Engemann et al. Dabei ist die postoperative Mortalitätsrate der Patienten mit einer MRSA-infizierten chirurgischen Wunde um das zwölfwache zu nicht infizierten Patienten erhöht, im Verhältnis zu MSSA infizierten Wunden steigt sie um das dreifache (ENGEMANN 2003). Auch die Aufenthaltsdauer verlängert sich bei einer Infektion mit resistenten Keimen, da diese Erkrankungen in ihren therapeutischen Möglichkeiten geringer und dadurch aufwendiger sind. Hier gibt es Berichte über mittlerweile mehr als 100 Isolate, die nicht nur Methicillin-resistent, sondern auch Glykopeptid intermediär resistent (GISA) sind. Seit 1997 sind bis heute insgesamt vier Stämme weltweit beschrieben, die resistent gegen Vancomycin (VRSA) sind (CDC2002a; CDC2002b; CDC2004; APPELBAUM 2006b; TENOVER 2004). In einer Studie wird von einer Verdreifachung der Liegezeit bei einer MRSA-induzierten Infektion im Vergleich zu einer MSSA bedingten Infektion berichtet (ABRAMSON 1999). Parallel mit dem verlängerten Krankenhausaufenthalt steigen auch die Kosten für die Behandlung. Daher ist es unbedingt erforderlich, Strategien zur Prävention von MRSA-bedingten Infektionen zu entwickeln. Diese könnten sich an der Handhabung in den Niederlanden und Dänemark orientieren, die nach dem sogenannten "search and destroy" Prinzip handeln. Dieses besteht aus einem konsequenten Screening von Risikopatienten und der Isolierung von Keimträgern (WERNITZ 2005b). Obwohl die Kontamination von Krankenhausgegenständen und der Umgebung eine wichtige Rolle in der Übertragung von MRSA spielen, ist das Hauptübertragungsreservoir der mit

MRSA kolonisierte oder infizierte Patient via Krankenhauspersonal (GIROU 1998). Die Übertragungsrate von MRSA bei der Isolierung von kolonisierten bzw. infizierten Patienten ist signifikant niedriger als ohne Isolierung der Patienten. Bei einer Ausbruchssituation von MRSA auf einer Säuglingsstation konnte sogar gezeigt werden, dass durch die Isolierung das Risiko der Übertragung um das 16fache gesenkt worden war (JERNIGAN 1996). Daher gilt es, MRSA-Träger frühzeitig durch Screeninguntersuchungen zu identifizieren. Das Screening von Neuaufnahmen im Krankenhaus kann sich auf unterschiedliche Patientenkollektive beziehen. So wurden in einer Studie in zwei Perioden einerseits alle Neuzugänge auf MRSA getestet (systematisches Screening), andererseits Proben nur von Patienten eines Risikokollektivs genommen (selektives Screening). Ein Risikopatient wird als ein solcher angesehen, wenn zwei der vom Robert Koch-Institut festgelegten Risikofaktoren für eine MRSA-Infektion vorhanden sind. Dazu gehören unter anderem: bekannte MRSA-Besiedlung oder -Infektion in der Krankengeschichte, chronische Pflegebedürftigkeit, liegende Katheter, Weichteilinfektionen, Brandverletzungen (KOMMISSION FÜR KRANKENHAUSHYGIENE UND INFEKTIONSPRÄVENTION AM ROBERT KOCH-INSTITUT 2004). In beiden Perioden war die Rate der identifizierten MRSA-Träger gleich hoch. Die Strategie des Screenings von Risikopatienten ist also gleich sensitiv wie das systematische Screening. Dabei verursacht das selektive Screening weniger Kosten und weniger Arbeitsaufwand (GIROU 2000). Wernitz et al. untersuchten über 19 Monate Risikopatienten mit einem selektiven Screening und über 19 Monate eine Kontrollgruppe ohne Screening. Die aus der Kontrollgruppe errechnete Rate von MRSA-Infektionen aus der Anzahl der positiv auf MRSA getesteten Patienten in der Screeninggruppe wurde nur knapp zur Hälfte erreicht. 48% der vorhergesagten MRSA-Infektionen konnten durch das Screening präventiv behandelt werden (WERNITZ 2005b). Durch die Verhinderung von MRSA-Infektionen werden enorme Kosten gespart, die auch noch eindrucksvoll sind, wenn die Kosten für das Screening abgezogen werden. Derzeit belaufen sich die Kosten für das Screening eines Patienten, bei dem kein MRSA festgestellt wird, auf € 39,96 und auf € 82,33 bei einem MRSA-positiven Patienten, da hier noch mehr Proben entnommen werden. In der Studie wurden anhand der abgewendeten Infektionen (48%) Kosten in der Höhe von € 200.782,73 gespart. Nach Abzug der Kosten für das Screening blieb weiterhin eine Einsparung von € 110.236,56 bestehen. Mit dem neu in Deutschland eingeführten Krankenhauskostenabwicklungssystem, die Diagnose Related Groups (DRG), werden die Kosten für einen durch eine MRSA-Infektion bedingten verlängerten Krankenhausaufenthalt nicht mehr adäquat finanziert. Durch ein Screeningprogramm

ist es möglich, die Kosteneffizienz des Krankenhauses und die Länge des Krankenhausaufenthalts zu optimieren. Die Kosteneffizienz des selektiven Screenings ist auch für Krankenhäuser geeignet, in denen eine endemische MRSA-Situation vorliegt (WERNITZ 2005a). Um die nosokomiale Übertragung von MRSA zu reduzieren, sind also das Screening und die Isolierung von Risikopatienten bis zum Bekanntwerden der mikrobiologischen Ergebnisse sinnvoll. Bei positivem MRSA-Nachweis sollte eine Erdikation des Keims unternommen werden. Des Weiteren ist die Schulung des Personals und der Patienten in Hygienemaßnahmen sowie das Aufklären für die Akzeptanz und den Erfolg der eingeleiteten Maßnahmen enorm bedeutungsvoll.

Neben der Verhinderung einer Übertragung von MRSA durch die genannten präventiven Maßnahmen muss eine Aufklärung von Infektionsketten stattfinden; besonders da die Transmission nicht nur von weiteren Patienten, sondern auch vom Personal oder der unbelebten Umwelt ausgehen kann. Um Zusammenhänge in Form von Infektionsketten zu erkennen ist eine Genotypisierung von Isolaten erforderlich. Die Anforderungen an eine solche routinemäßige Typisierung von MRSA sollten einen geringen Arbeitsaufwand haben, daher ist eine *single locus sequence*-Typisierung anzuraten. Des Weiteren sollte die Methode DNA-basiert sein, um einen einfachen Datenaustausch zu gewährleisten. Eine Datenbank sollte über das Internet zu Verfügung stehen, um internationale Surveillance zu unterstützen. Diese Punkte für die routinemäßige Typisierung von MRSA vereinigt die *spa*-Typisierung. Der Nutzen dieser Methode für ein Krankenhaus der Maximalversorgung zeigt sich vielseitig. Die *spa*-Typisierung erlaubt eine schnelle und objektive Identifizierung von MRSA-Klustern und Infektionsketten. Sie unterstützt die Aufdeckung von epidemiologischen Zusammenhängen auch bei solchen MRSA-Fällen, die in geringer Zahl über einen längeren Zeitraum auftreten. Auch in der eigenen Untersuchung konnten Zusammenhänge mit Hilfe der *spa*-Typisierung herausgearbeitet werden. Bei zwei Patienten, die auf derselben Station behandelt wurden, konnte innerhalb weniger Tage der gleiche *spa*-Typ isoliert werden. Bei beiden Patienten fand bis zur Entlassung nur eine unzureichende Erdikation des Keims statt. Zwei bzw. vier Monate später waren beide an einer MRSA-bedingten Sepsis erkrankt, bei der wiederum derselbe *spa*-Typ isoliert wurde. Die hohe Zahl der MRSA-Isolate aus Stuhl in der Studie lässt auf eine bedeutende Übertragungskette von MRSA über den Vektor Stuhl schließen, der bisher wenig Beachtung geschenkt wurde. Auch bei den Patienten unserer Untersuchung mit einer manifesten MRSA-Infektion wurden MRSA aus den betroffenen Körperregionen

und Stuhlproben isoliert. In allen Proben konnte jeweils der gleiche *spa*-Typ bzw. PFGE-Typ identifiziert werden, was ein gleich hohes Übertragungsrisiko aller befallenen und positiv getesteten Kompartimente (Stuhl, Urin, Blut) bedeutet. Sowohl bei Screeninguntersuchungen auf MRSA als auch bei Kontrolluntersuchungen des Sanierungserfolges der Erdikationstherapie nach den Hygienerichtlinien des Robert Koch-Instituts werden Proben nur aus Nase, Stirn, Rachen und dem befallenen Segment, nicht aber aus Stuhl, falls der Gastrointestinaltrakt nicht primär befallen ist, entnommen. So kommt es aufgrund einer fehlenden Identifikation von MRSA-Besiedlung des Gastrointestinaltrakts zu unzureichender Erdikation des Keims, der eine MRSA-Infektion folgt oder eine Re-Kolonisation, die bei Wiederaufnahme im Krankenhaus festgestellt wird. Es ist anzunehmen, dass durch Stuhl kontaminierte Bett- und Schlafwäsche nicht als Übertragungsweg wahrgenommen wird und es so trotz Einhaltung von Hygienerichtlinien zu chronischen MRSA-Besiedlungen oder endemischen MRSA-Situationen in Krankenhäusern bzw. in Alten- und Pflegeheimen führt (KLOTZ et al. 2005).

Weiterhin konnten bei der hier durchgeführten Untersuchung die aus MRSA-Isolaten aus dem Stuhl ermittelten *spa*-Typen anhand der epidemiologischen Daten oft in einen zeitlichen und räumlichen Zusammenhang gebracht werden. So konnte auf einzelnen Stationen häufig bei Proben, die in einem kurzen Zeitraum entnommen wurden, derselbe *spa*-Typ ermittelt werden.

Ebenfalls können erstmalige Nachweise von bisher nicht beobachteten *spa*-Typen Hinweise auf die Herkunft des Stammes geben. Möglicherweise hat der Patient in so einem Fall diesen Stamm in einer anderen Institution erworben, welche daraufhin informiert und zu stärkeren Präventionsmaßnahmen angeregt werden sollte. Weitere Patienten dieser Institution werden eventuell in Zukunft als Risikopatienten angesehen und einem Screening unterzogen.

Die häufig aufgrund der angespannten räumlichen und personellen Verhältnisse geforderte Kohortenisolierung birgt das Risiko, dass Patienten mit einem sporadischen, seltenen MRSA-Klon zusätzlich ein epidemisches Isolat akquirieren. Die *spa*-Typisierung bietet ein schnelles und objektives Kriterium, ob die Kohortenisolierung verhindert werden muss oder durchgeführt werden kann (VOGEL 2005). In dieser Schnelligkeit sowie in der einfachen Durchführung und Handhabung liegen die klaren Vorteile der *spa*-Typisierung. Als Einführung in den routinemäßigen Krankenhausalltag



unterstützt sie somit krankenhaushygienische Maßnahmen zur Eindämmung von MRSA. Als „portable“ Methode bietet die *spa*-Typisierung zuverlässige Ergebnisse mit einer zufriedenstellenden Diskriminierung. Auch wenn es immer wieder Hinweise darauf gibt, dass die PFGE mit einer höheren Diskriminierung die geeignetere Methode zur Untersuchung von epidemiologischen Langzeitstudien ist, gibt es ebenfalls Hinweise, dass auch die *spa*-Typisierung mit steigender Etablierung diese Diskriminierungseffizienz erreicht. In einer Untersuchung, in der Methoden zur Differenzierung von *S. aureus* mit epidemiologischen Langzeit- und Kurzzeitproben verglichen wurden, war die Diskriminierung der *spa*-Typisierung höher als die der PFGE und der anderen Methoden (KOREEN 2004). Es gibt auch Meinungen, dass die Differenzierung von MRSA-Stämmen mit der PFGE als hyperdiskriminatorisch einzustufen ist. Grundlage für diese Meinung ist die Beobachtung, dass bei der Entnahme mehrerer Isolate eines Patienten bereits kleine Variationen der einzelnen Bandenmuster der PFGE beschrieben wurden (PEACOCK 2002). In der vorgelegten Untersuchung, in der MRSA-Isolate aus Stuhl analysiert wurden, die über 26 Monate gesammelt worden sind, kann die *spa*-Typisierung in Bezug auf die Höhe der Diskriminierung als gleichwertige Methode zu PFGE angesehen werden. Aufgrund der Eindeutigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse, der Schnelligkeit sowie der Möglichkeit der Nutzung von elektronischen Datenbanken und der Einfachheit der Durchführung bzw. Etablierung im Labor ist die *spa*-Typisierung zur Differenzierung von MRSA-Stämmen vor allem in Ausbruchsuntersuchungen besonders geeignet.

Zur weiteren Untersuchung sowie zur Abschätzung der Bedeutung und der Ausmaße von MRSA-Übertragung über Stuhl aufgrund fehlender Identifikation und unzureichender Erdikationstherapie erscheinen follow-up Studien nötig.

## 6. Zusammenfassung

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* gehören zu den Haupterregern nosokomialer Infektionen, die von leichten Weichteil- und Hautinfektionen bis hin zur Pneumonie oder Sepsis auch zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie das Toxic Shock Syndrom (TSS) reichen. Die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen, insbesondere Methicillinresistenz, stellt eines der größten Probleme der Krankenhaushygiene und der Infektiologie dar. Die Typisierung und Charakterisierung der MRSA-Stämme ist Grundlage für ein fundiertes Infektionsmanagement.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *spa*-Typisierung eine geeignete Methode zur Charakterisierung von MRSA-Stämmen ist. In ihrem Differenzierungsgrad ist die Methode gegenüber der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), die als Goldstandard angesetzt wird, als gleichwertig anzusehen. Bei der Charakterisierung der aus Stuhl gewonnenen Proben durch beide Methoden zeigte sich eine überwiegende Deckung der Ergebnisse. Beim Vergleich von Patientenproben mit manifester MRSA-Infektion ergab sich eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse. Zudem besticht die *spa*-Typisierung als Methode mit dem Vorteil des erheblich geringeren Zeitaufwandes, der niedrigeren Kosten und der weniger komplizierten technischen Laborarbeit. Diese Überlegenheiten der *spa*-Typisierung sind vor allem durch die Entwicklung der Datenbank-basierten Sequenzanalyse ([www.staphype.ridom.de](http://www.staphype.ridom.de)) und der dazugehörigen Software (RidomStaph®) hervorgetreten, mit der auch die Ergebnisse dieser Arbeit ermittelt wurden. Daraus ergibt sich zusätzlich als entscheidender Vorteil, dass die ermittelten Daten interpretationsfrei beurteilt werden können und die Möglichkeit besteht, diese per elektronischem Datenaustausch schnell mit anderen Laborergebnissen oder der Datenbank im Internet zu vergleichen.

Diese Punkte zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sprechen für die Befürwortung der Etablierung der *spa*-Typisierung als Charakterisierungsmethode von MRSA-Stämmen. Krankenhausspezifische MRSA-Muster lassen sich sicher darstellen und Infektionsketten rekonstruieren, sodass eine Routinediagnostik mit Stammtypisierung von MRSA konsequent die Aufdeckung von Infektionswegen unterstützt und infolge dessen eine systematische Isolierung möglich ist. Diese Art der Isolierung fördert die Reduktion von Behandlungskosten in erheblichen Maßen.

Alle hier ermittelten Vergleichswerte der *spa*-Typisierung zeigen sie als überaus wertvolle und gleichwertige ergänzende Methode zu den etablierten Standardmethoden bei Langzeitstudien. Mit den vorliegenden Ergebnissen wird die Überlegenheit der Methode für die Routinediagnostik und den Einsatz bei Ausbruchssituationen aufgrund der oben genannten Vorteile unterstrichen.

## 7. Appendix

### 7.1. Tabellen

**Tabelle 7.1-1: Verteilung der *spa*-Typen**

| <i>spa</i> -Typ | Anzahl Proben | Anzahl in Prozent |
|-----------------|---------------|-------------------|
| t001            | 10            | 21,3              |
| t002            | 1             | 2,1               |
| t003            | 25            | 53,2              |
| t004            | 3             | 6,4               |
| t030            | 1             | 2,1               |
| t032            | 4             | 8,5               |
| t189            | 1             | 2,1               |
| t294            | 1             | 2,1               |
| t432            | 1             | 2,1               |

**Tabelle 7.1-2: Verteilung der PFGE-Typen**

| PFGE Typen | Anzahl Proben | Anzahl in Prozent |
|------------|---------------|-------------------|
| PFGE 1     | 26            | 55,3              |
| PFGE 2     | 8             | 17,0              |
| PFGE 3     | 1             | 2,1               |
| PFGE 4     | 1             | 2,1               |
| PFGE 5     | 1             | 2,1               |
| PFGE 6     | 6             | 12,8              |
| PFGE 7     | 1             | 2,1               |
| PFGE 8     | 1             | 2,1               |
| PFGE 9     | 2             | 4,3               |

**Tabelle 7.1-3: Probenverteilung im Methodenvergleich**

| <i>spa</i> -<br>Typ | PFGE<br>Typ | Proben Nr.  | Repeats | <i>spa</i> -<br>Typ | PFGE<br>Typ | Proben Nr.  | Repeats |
|---------------------|-------------|-------------|---------|---------------------|-------------|-------------|---------|
| t003                | PFGE 1      | 00203313    | 8       | t001                | PFGE 2      | KH0003695/1 | 10      |
| t003                | PFGE 1      | KH01699     | 8       | t001                | PFGE 2      | 00132941    | 10      |
| t003                | PFGE 1      | 00207158    | 8       | t001                | PFGE 2      | 00133486    | 10      |
| t003                | PFGE 1      | 00207163    | 8       | t001                | PFGE 2      | KH0003445   | 10      |
| t003                | PFGE 1      | 00207687    | 8       | t001                | PFGE 2      | 00308406    | 10      |
| t003                | PFGE 1      | 00211155    | 8       | t001                | PFGE 2      | KH0002709/3 | 10      |
| t003                | PFGE 1      | 00213603    | 8       | t001                | PFGE 3      | KH0002801/2 | 10      |
| t003                | PFGE 1      | 00300361    | 8       | t001                | PFGE 7      | 00307704    | 10      |
| t003                | PFGE 1      | 00300359    | 8       | t001                | PFGE 9      | KH03585/3   | 10      |
| t003                | PFGE 1      | 00301307    | 8       | t001                | PFGE 9      | KH03540/4   | 10      |
| t003                | PFGE 1      | 00301495    | 8       |                     |             |             |         |
| t003                | PFGE 1      | 00302454    | 8       | t032                | PFGE 6      | 00209925    | 16      |
| t003                | PFGE 1      | 00229542    | 8       | t032                | PFGE 6      | KH0003208   | 16      |
| t003                | PFGE 1      | 00304321    | 8       | t032                | PFGE 6      | 00125961    | 16      |
| t003                | PFGE 1      | 00306445    | 8       | t032                | PFGE 6      | KH02261/4   | 16      |
| t003                | PFGE 1      | 00308132    | 8       |                     |             |             |         |
| t003                | PFGE 1      | KH0003029/4 | 8       | t004                | PFGE 2      | 00222660    | 9       |
| t003                | PFGE 1      | 00113282    | 8       | t004                | PFGE 2      | 00227080    | 9       |
| t003                | PFGE 1      | 0002423/I   | 8       | t004                | PFGE 4      | 00110771    | 9       |
| t003                | PFGE 1      | 00127564    | 8       |                     |             |             |         |
| t003                | PFGE 1      | KH01135/3   | 8       | t030                | PFGE 8      | 00311477    | 6       |
| t003                | PFGE 1      | KH003998/4  | 8       | t294                | PFGE 6      | 00224795    | 17      |
| t003                | PFGE 1      | KH06191/47  | 8       | t432                | PFGE 6      | 00228455    | 15      |
| t003                | PFGE 1      | 00117929    | 8       | t002                | PFGE 1      | 00231214 II | 10      |
| t003                | PFGE 5      | 00308347    | 8       | t189                | PFGE 1      | 00312236    | 6       |

**Tabelle 7.1-4: Muster der MRSA *spa*-Typen auf den Stationen**

| Station | Datum    | Probe       | <i>spa</i> -Typ |
|---------|----------|-------------|-----------------|
| 021     | 28.03.01 | 0002423/I   | t003            |
|         | 19.07.01 | KH0003029/4 | t003            |
|         | 11.03.02 | 00207158    | t003            |
|         | 24.04.02 | 00211155    | t003            |
|         | 28.05.02 | 00213603    | t003            |
|         | 28.08.02 | 00222660    | t004            |
|         | 14.10.02 | 00227080    | t004            |
|         | 19.11.02 | 00230693    | n.n             |
|         | 19.05.03 | 00312236    | t189            |
|         |          |             |                 |
| I1      | 07.01.01 | KH01135/3   | t003            |
|         | 27.04.01 | 00110771    | t004            |
|         | 25.03.02 | KH02261/4   | t032            |
|         | 08.11.02 | 00229542    | t003            |
|         | 15.11.02 | KH06160/95  | n.n             |
|         | 03.04.03 | 00308347    | t003            |
|         |          |             |                 |
| I2      | 26.07.02 | KH03540/4   | t001            |
|         | 05.08.02 | KH03585/3   | t001            |
|         |          |             |                 |
| I3      | 27.03.03 | 00307704    | t001            |
|         |          |             |                 |
| I4      | 00.01.00 | KH06160/95  | n.n             |
|         |          |             |                 |
| I5      | 15.11.02 | 00113282    | t003            |
|         |          |             |                 |
| I8      | 23.05.01 | KH0002801/2 | t001            |
|         | 07.09.01 | 00124577    | n.n             |
|         | 03.10.01 | 00127564    | t003            |
|         | 14.11.01 | KH0003695/1 | t001            |
|         | 21.11.01 | 00132941    | t001            |
|         | 26.11.01 | 00133486    | t001            |
|         | 15.01.02 | KH0003208   | t032            |
|         | 17.01.02 | KH01293     | n.n             |
|         | 18.03.02 | 00207687    | t003            |
|         | 06.01.03 | 00300361    | t003            |
|         | 16.01.03 | 00301307    | t003            |

| Station | Datum    | Probe       | <i>spa</i> -Typ |
|---------|----------|-------------|-----------------|
| I8      | 17.02.03 | 000304100   | n.n             |
|         | 19.02.03 | 00304321    | t003            |
|         | 11.04.03 | KH06191/47  | t003            |
|         |          |             |                 |
| 331     | 19.07.01 | 00117929    | t003            |
|         | 05.10.01 | KH0003445   | t001            |
|         | 26.02.02 | 00209925    | t032            |
|         | 20.01.03 | 00301495    | t003            |
|         |          |             |                 |
| 223     | 12.03.03 | 00306445    | t003            |
|         | 04.04.03 | 00308406    | t001            |
|         | 11.04.03 | KH06191/47  | t003            |
|         |          |             |                 |
| 236     | 07.01.01 | KH01135/3   | t003            |
|         | 09.05.01 | KH0002709/3 | t001            |
|         | 14.02.02 | KH01699     | t003            |
|         | 08.11.02 | 00229542    | t003            |
|         | 25.03.02 | KH02261/4   | t032            |
|         |          |             |                 |
| 226     | 11.03.02 | 00207163    | t003            |
|         | 21.09.02 | 00125961    | t032            |
|         |          |             |                 |
| 136     | 21.12.01 | KH003998/4  | t003            |
|         |          |             |                 |
| 221     | 15.01.02 | KH0003208   | t032            |
|         | 29.10.02 | 00228455    | t432            |
|         |          |             |                 |
| Neuro2b | 22.11.02 | 00231214 II | t002            |
|         |          |             |                 |
| Neuro3b | 31.01.03 | 00302454    | t003            |
|         |          |             |                 |
| F1      | 19.09.02 | 00224795    | t294            |
|         |          |             |                 |
| CHD     | 04.04.03 | 00308406    | t001            |
|         | 19.05.03 | 00312236    | t189            |
|         |          |             |                 |
| 137     | 15.11.02 | KH06160/95  | n.n             |

**Tabelle 7.1-5: *spa*-Typen der Patientenproben**

|            | <i>spa</i> -Typ | Proben      | Entnahme   |
|------------|-----------------|-------------|------------|
| Patient 01 |                 |             |            |
| Stuhl      | t003            | KH0003029/4 | 19.07.2001 |
| BK         | t003            | 0119032     |            |
| Nase       | t003            | 3029/6      |            |
|            |                 |             |            |
| Patient 02 |                 |             |            |
| BK         | t003            | 00113233    | 23.05.2001 |
| Stuhl      | t003            | 00113282    |            |
| Urin       | t003            | 00113174    |            |
|            |                 |             |            |
| Patient 03 |                 |             |            |
| Stuhl      | t003            | 00213603    | 28.05.2003 |
| Nase       | t003            | 02817/2a    |            |
| BK         | t003            | 00213820    |            |
|            |                 |             |            |
| Patient 04 |                 |             |            |
| Wunde      | t003            | 00229449    | 08.11.2002 |
| Stuhl      | t003            | 00229542    |            |
|            |                 |             |            |
| Patient 05 |                 |             |            |
| Stuhl      | t001            | KH0003445   | 05.10.2001 |
| Nase       | t001            | 0003448/2   |            |
| Wunde      | t001            | 00134039    |            |
|            |                 |             |            |
| Patient 06 |                 |             |            |
| Stuhl      | t032            | KH01952/2   | 07.03.2002 |
| Nase       | t032            | 00205925    | 26.02.2002 |
| Liquor     | n.n             | 00207303    |            |

**Tabelle 7.1-6: *spa*-Typisierung der deutschen Epidemiestämme**

| Probe     | Stammname          | <i>spa</i> -Typ | Sequenzier Typ (ST) |
|-----------|--------------------|-----------------|---------------------|
| MRSA/131  | "Süddeutscher"     | t001            | ST 28               |
| MRSA/994  | "Süd-Ostdeutscher" | t139            | n.n                 |
| MRSA/134  | "Norddeutscher"    | t051            | ST247               |
| MRSA/1150 | "Berliner"         | t004            | ST45                |
| MRSA/ST5  | "Rhein-Hessen"     | t002            | ST5                 |
| MRSA/1000 | "Hannoveraner"     | t009            | ST254               |
| MRSA/635  | "Wiener"           | t037            | ST239               |
| MRSA/1678 | "Barnim"           | t032            | ST22                |

**Tabelle 7.1-7: Repeat-Reihenfolge der ermittelten *spa*-Typen**

| <i>spa</i> -Typ | Repeat-Reihenfolge                                 | Repeatanzahl |
|-----------------|--|--------------|
| t001            | 26-30-17-34-17-20-17-12-17-16                      | 10           |
| t002            | 26-23-17-34-17-20-17-12-17-16                      | 10           |
| t003            | 26-17-20-17-12-17-17-16                            | 8            |
| t004            | 09-02-16-13-13-17-34-16-34                         | 9            |
| t030            | 15-12-16-02-24-24                                  | 6            |
| t032            | 26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28    | 16           |
| t189            | 07-23-12-21-17-34                                  | 6            |
| t294            | 26-23-23-13-16-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28 | 17           |
| t432            | 26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16       | 15           |



## 7.2. Abbildungen

**Abbildung 7.2-1: Amplifikation des *spa*-Gens: dargestellt sind PCR-Produkte 9 verschiedener MRSA-Isolate (Probennummer 1-9). Das Amplifikationsprodukt liegt bei ca 350 bp.**

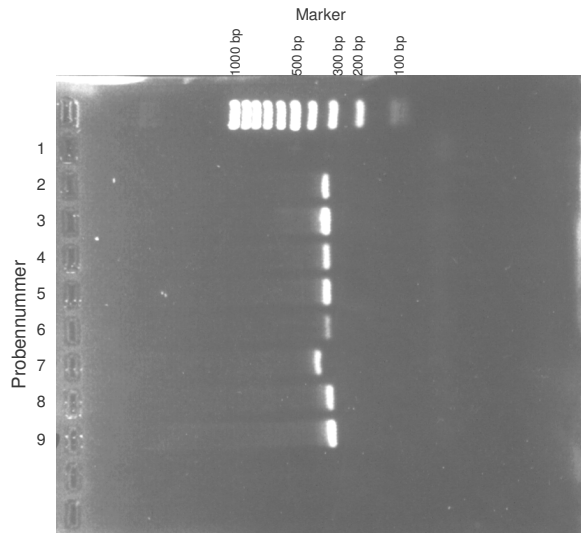


Abbildung 7.2-2: Sequenzierergebnis des *spa*-Typs t003, Hauptklon der Untersuchung (Forwardreaktion)

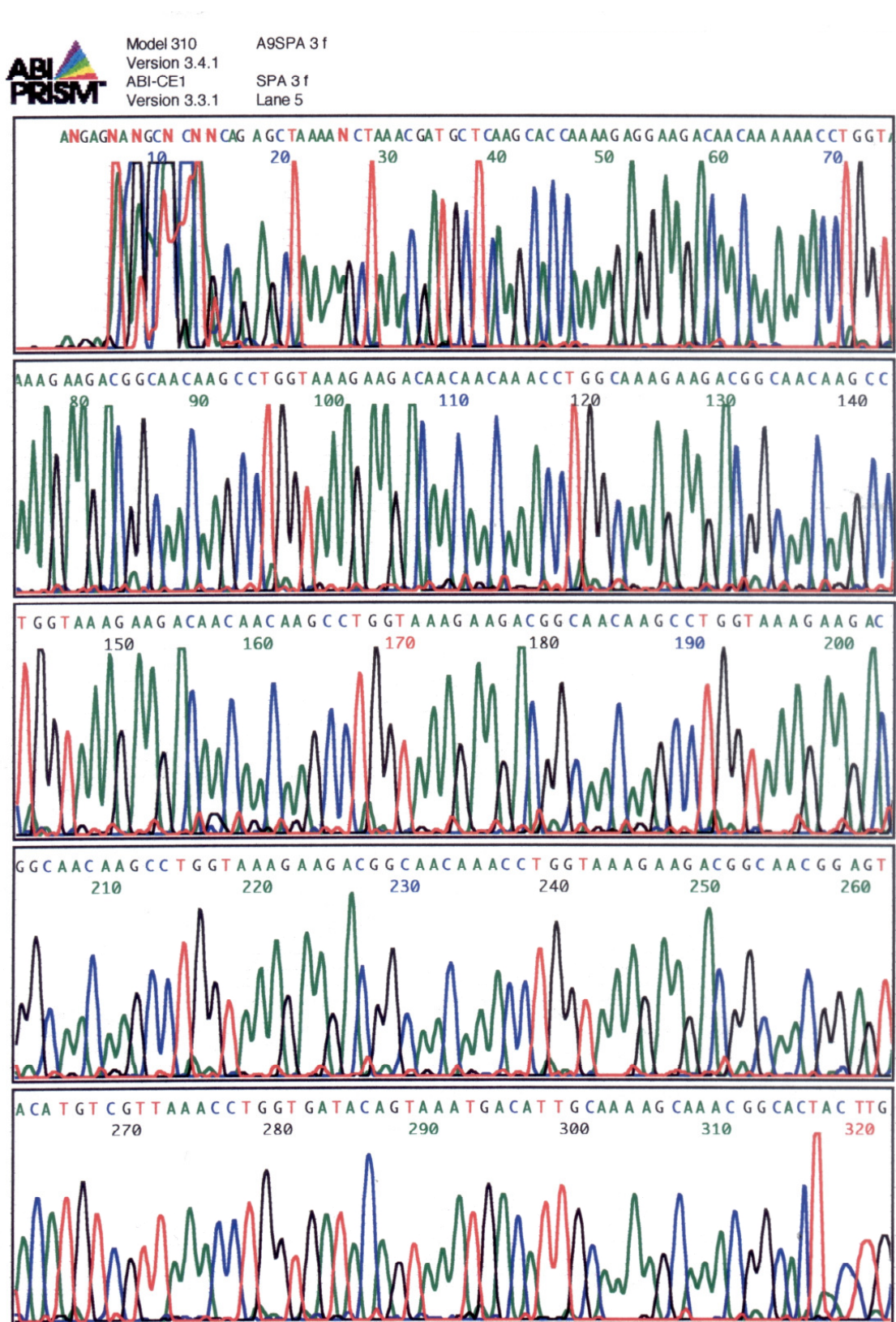


Abbildung 7.2-3: Sequenzierergebnis des *spa*-Typs t003, Hauptklon der Untersuchung (Reversereaktion)

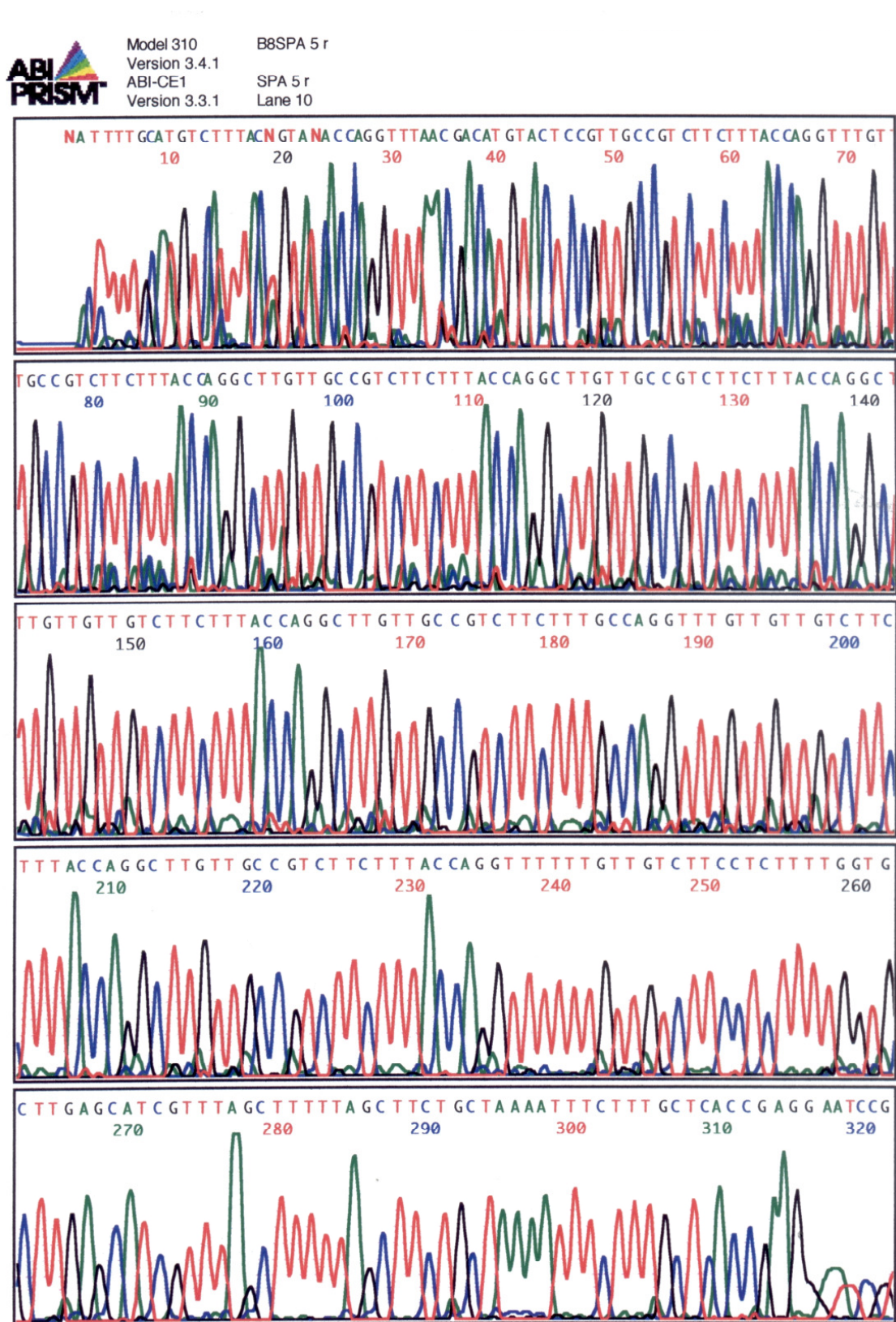




Abbildung 7.2-4: Sequenzierergebnis des „Rhein-Hessen“-Epidemiestamms (Forwardreaktion)

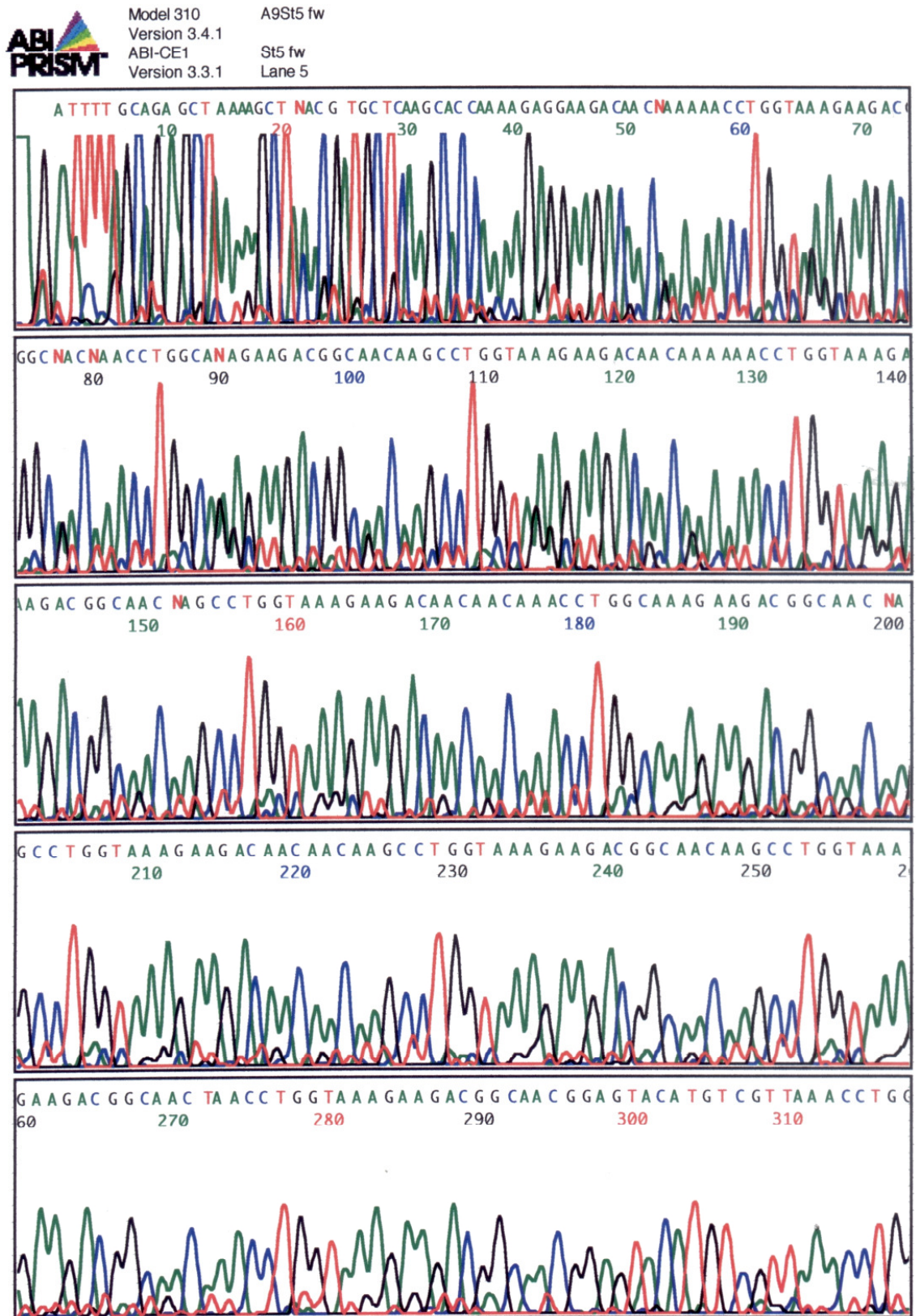
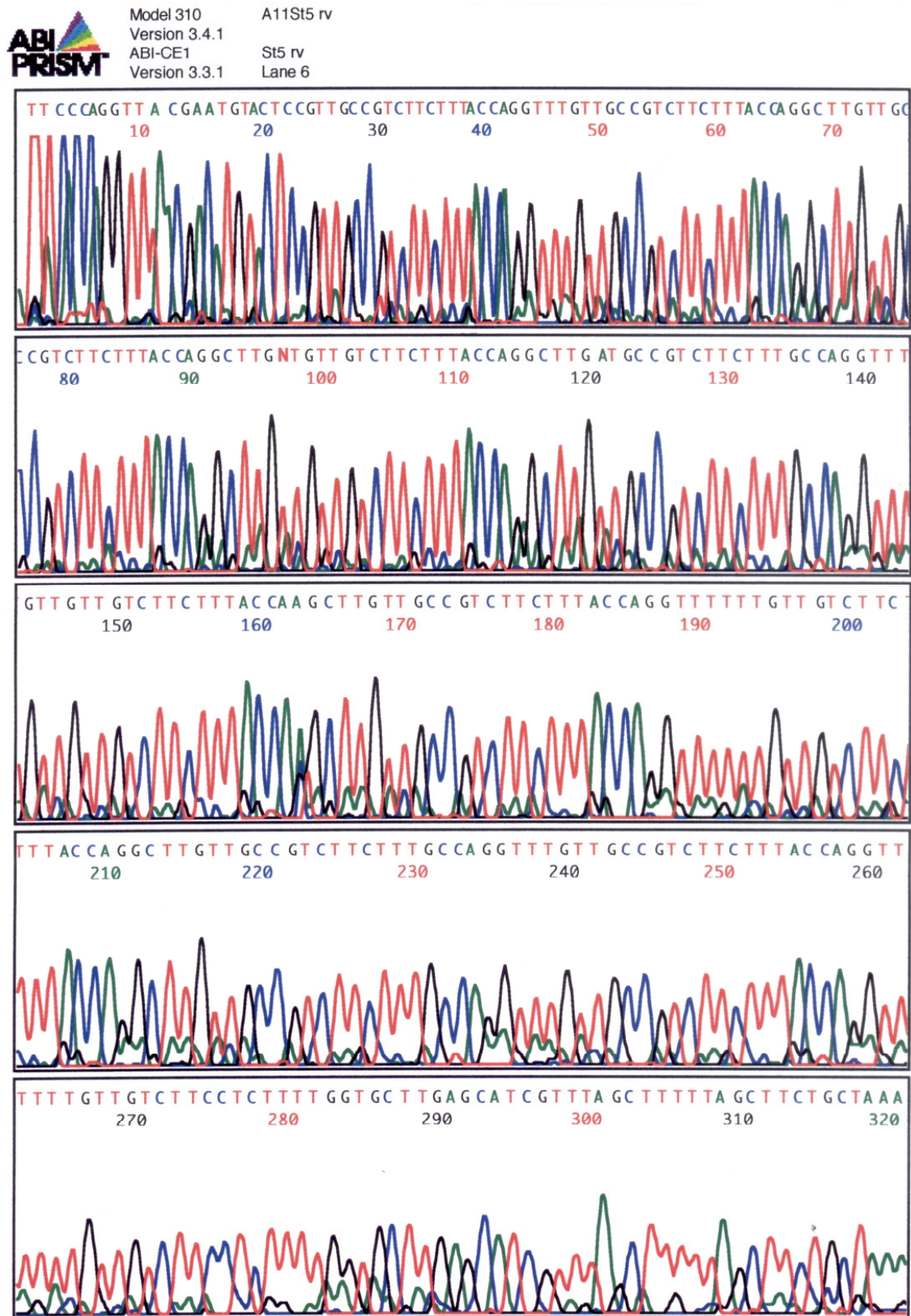


Abbildung 7.2-5: Sequenzierergebnis des „Rhein-Hessen“-Epidemiestamms (Reversereaktion)

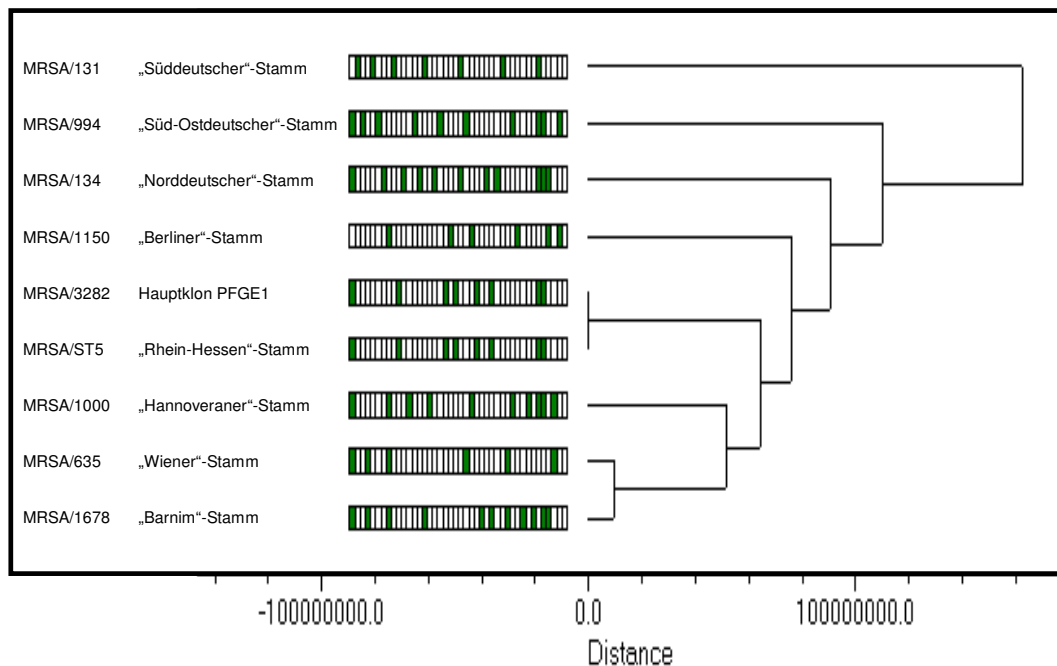


[illegible]

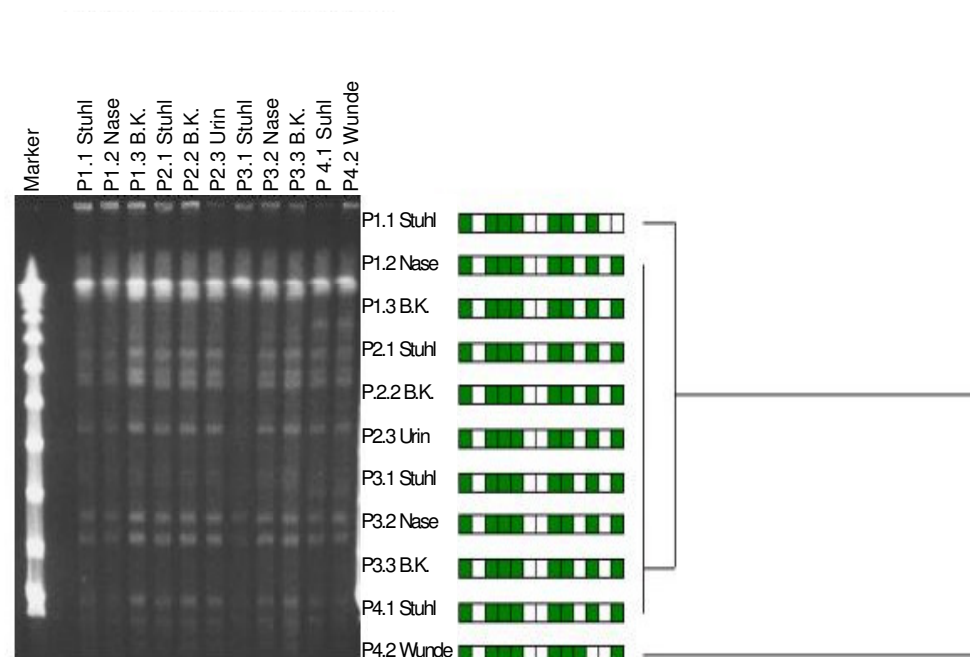
Phylogenetic tree of MRSA strains based on PFGE patterns. The tree shows two main clusters: PFGE 2 (top) and PFGE 1 (bottom). PFGE 2 includes MRSA/3695/1, MRSA/2941, MRSA/3486, MRSA/01293, and MRSA/3313. PFGE 1 includes MRSA/01699, MRSA/7158, MRSA/7163, MRSA/7687, MRSA/1155, MRSA/3603, and MRSA/5925. The x-axis represents genetic distance from -400,000.0 to 600,000.0. Strains are represented by horizontal bars with green and white segments indicating specific PFGE patterns.



**Abbildung 7.2-8:** Dendrogramm der PFGE der deutschen Epidemistämme und einer exemplarischen Probe des Hauptklons/PFGE 1. Es zeigt sich ein identisches Bandenmuster des Hauptklons zum MRSA/St-5 – „Rhein-Hessen“-Stamm.



**Abbildung 7.2-9:** PFGE Bild und Dendrogramm der Patienten 01-04 (P1-4), bei allen Patienten wurde in allen entnommenen Proben derselbe PFGE-Typ (PFGE 1) sowie derselbe *spa*-Typ t003 identifiziert.



### 7.3. Abkürzungen

|                  |   |
|------------------|---|
| ®                | registrierte Marke  |
| %                | Prozent   |
| β                | Beta  |
| °C               | Grad Celsius  |
| λ                | Lambda  |
| €                | Euro  |
| Bhi-Medium       | Brain-Heart-Infusion  |
| bp               | Basenpaare  |
| CDC              | Centers for Disease Control and Prevention                              |
| ccrA             | Rekombinase   |
| ccrB             | Rekombinase   |
| <i>clfB</i>      | clumping factor B-Gen   |
| cm               | Zentimeter  |
| cMRSA            | community acquired Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>coa</i> -Gen  | Coagulase-Gen   |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure  |
| dNTP             | Desoxyribonukleoisidtriphosphat   |
| DRG              | Diagnose Related Group  |
| EC Puffer        | Extractions Puffer  |
| EDTA             | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| Fc-Fragment      | fragment crystalline der Immunglobuline                                 |
| <i>fem</i>       | Regulatoren SCCmec Gen  |
| g                | Erdbeschleunigung   |
| GISA             | Glykopeptid intermediär-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>        |
| h                | Stunde  |
| HCl              | Chlorwasserstoff  |
| IS 431           | Regulatoren SCCmec Gen  |
| kb               | Kilobasen   |
| kD               | Kilodalton  |
| KISS             | Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System                              |
| <i>lukS-lukF</i> | kodierender Abschnitt für Panthion-Valentin-Leucozidin                  |
| M                | Molare Masse  |
| <i>mecA</i>      | Regulatoren SCCmec Gen  |
| min              | Minute  |



|                  |  |
|------------------|--|
| µl               | Microliter   |
| mg               | Milligramm   |
| ml               | Milliliter   |
| MLST             | Multi Locus Sequenz Typisierung                      |
| MRSA             | Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> |
| MSSA             | Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>   |
| NaCl             | Natriumchlorid                                       |
| ng               | Nanogramm  |
| NRZ              | Nationales Referenz Zentrum                          |
| PBP              | Penicillin-bindendes Protein                         |
| PCR              | Polymerase-Kettenreaktion                            |
| PEG-Sonde        | Perkutane Endoskopische Gastrostomie-Sonde           |
| PFGE             | Pulsfeldgelelektrophorese                            |
| pmol             | Picomol  |
| PVL              | Panthon-Valentin-Leucozidin                          |
| rpm              | Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)        |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i>                         |
| SCC              | Staphylococcal chromosomal cassette                  |
| SDS Puffer       | Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)        |
| sec              | Sekunde  |
| <i>Smal</i>      | Arbeitspuffer  |
| <i>spa</i>       | kodierender Abschnitt des Protein A                  |
| SSR              | short sequence repeat                                |
| ST               | Sequenzier Typ                                       |
| TAE Puffer       | Tris-HCl+ Acetate+ EDTA                              |
| TBE Puffer       | Tris-HCl+ Borsäure+ EDTA                             |
| TE Puffer        | Tris-HCl+ EDTA                                       |
| TEN Puffer       | Tris-HCl+ EDTA+ NaCl                                 |
| Tn 554           | Regulatoren SCCmec Gen                               |
| TSR Puffer       | Template Supression Reagent                          |
| TSS              | Toxic Staphylococcal Syndrom                         |
| U                | Einheit (unit)                                       |
| UV               | Ultraviolett   |
| V                | Volt   |
| VRSA             | Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>  |

#### 7.4. Literaturverzeichnis

- Abramson, M.A.; Sexton, D.J.: Nosocomial methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* primary bacteremia: at what costs? Infect. Control Hosp. Epidemiol. : 20(6): 408-411; 1999
- Appelbaum, P.C.: MRSA--the tip of the iceberg. Clin. Microbiol. Infect. : 12 Suppl 2: 3-10; 2006a
- Appelbaum, P.C.: The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. : 12 Suppl 1: 16-23; 2006b
- BGB: Empfehlung Zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA) in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen. Mitteilung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention am RKI. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz: 42: 954-958; 1999
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention, *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. : 51(26): 565-567; 2002a
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention, Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--Pennsylvania, 2002. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. : 51(40): 902; 2002b
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention, Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* - New York, 2004. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. : 53(15): 322-323; 2004
- Chambers, H.F.: Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev. : 10(4): 781-791; 1997
- Chiou, C.S.; Wei, H.L.; Yang, L.C.: Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. : 38(6): 2186-2190; 2000
- Cosgrove, S.E.; Sakoulas, G.; Perencevich, E.N.; Schwaber, M.J.; Karchmer, A.W.; Carmeli, Y.: Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin. Infect. Dis. : 36(1): 53-59; 2003
- Crisostomo, M.I.; Westh, H.; Tomasz, A.; Chung, M.; Oliveira, D.C.; de Lencastre, H.: The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.: 98(17): 9865-9870; 2001
- Engemann, J.J.; Carmeli, Y.; Cosgrove, S.E.; Fowler, V.G.; Bronstein, M.Z.; Trivette, S.L.; Briggs, J.P.; Sexton, D.J.; Kaye, K.S.: Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with

*Staphylococcus aureus* surgical site infection. Clin. Infect. Dis. : 36(5): 592-598; 2003

- Enright, M.C.; Day, N.P.; Davies, C.E.; Peacock, S.J.; Spratt, B.G.: Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. : 38(3): 1008-1015; 2000
- Frenay, H.M.; Bunschoten, A.E.; Schouls, L.M.; van Leeuwen, W.J.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.; Verhoef, J.; Mooi, F.R.: Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of Protein A gene polymorphism. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. : 15(1): 60-64; 1996
- Girou, E.; Azar, J.; Wolkenstein, P.; Cizeau, F.; Brun-Buisson, C.; Roujeau, J.C.: Comparison of systematic versus selective screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in a high-risk dermatology ward. Infect. Control Hosp. Epidemiol. : 21(9): 583-587; 2000
- Girou, E.; Pujade, G.; Legrand, P.; Cizeau, F.; Brun-Buisson, C.: Selective screening of carriers for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in high-risk hospital areas with a high level of endemic MRSA. Clin. Infect. Dis. : 27(3): 543-550; 1998
- Harmsen, D.; Claus, H.; Vogel, U.: DNA sequence-based tandem repeat analysis of the *clfB* Gene is less discriminatory than *spa* typing for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int. J. Med. Microbiol. : 294(8): 525-528; 2005
- Harmsen, D.; Claus, H.; Witte, W.; Rothganger, J.; Claus, H.; Turnwald, D.; Vogel, U.: Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. J. Clin. Microbiol. : 41(12): 5442-5448; 2003
- Hiramatsu, K.; Hanaki, H.; Ino, T.; Yabuta, K.; Oguri, T.; Tenover, F.C.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother. : 40(1): 135-136; 1997
- Ito, T.; Katayama, Y.; Asada, K.; Mori, N.; Tsutsumimoto, K.; Tiensasitorn, C.; Hiramatsu, K.: Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. : 45(5): 1323-1336; 2001
- Jernigan, J.A.; Titus, M.G.; Groschel, D.H.; Getchell-White, S.; Farr, B.M.: Effectiveness of contact isolation during a hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am. J. Epidemiol. : 143(5): 496-504; 1996
- Katayama, Y.; Ito, T.; Hiramatsu, K.: A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. : 44(6): 1549-1555; 2000
- Klotz, M.; Zimmermann, S.; Opper, S.; Heeg, K.; Mutters, R.: Possible risk for re-colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by faecal transmission. Int. J. Hyg. Environ. Health. : 208(5): 401-405; 2005

- Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention am Robert Koch-Institut: Kommentar zu den "Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen im Krankenhaus und anderen medizinischen Einrichtungen". Epidemiologisches Bulletin: 46/2004; 2004
- Koreen, L.; Ramaswamy, S.V.; Graviss, E.A.; Naidich, S.; Musser, J.M.; Kreiswirth, B.N.: *Spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. J. Clin. Microbiol. : 42(2): 792-799; 2004
- Kotilainen, P.; Routamaa, M.; Peltonen, R.; Evesti, P.; Eerola, E.; Salmenlinna, S.; Vuopio-Varkila, J.; Rossi, T.: Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a health center ward and associated nursing home. Arch. Intern. Med. : 161(6): 859-863; 2001
- Ma, X.X.; Ito, T.; Tiensasitorn, C.; Jamklang, M.; Chongtrakool, P.; Boyle-Vavra, S.; Daum, R.S.; Hiramatsu, K.: Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob. Agents Chemother. : 46(4): 1147-1152; 2002
- Maslow, J.N.; Mulligan, M.E.; Arbeit, R.D.: Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin. Infect. Dis. : 17(2): 153-162; 1993
- Merrer, J.; Santoli, F.; Appere, d., V; Tran, B.; De Jonghe, B.; Outin, H.: "Colonization pressure" and risk of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. Infect. Control Hosp. Epidemiol. : 21(11): 718-723; 2000
- Montesinos, I.; Salido, E.; Delgado, T.; Cuervo, M.; Sierra, A.: Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and Protein A and coagulase gene polymorphisms. J. Clin. Microbiol. : 40(6): 2119-2125; 2002
- Mülhardt: Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). In: Mülhardt : Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics (3rd) Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin: 62-62; 2002
- Murchan, S.; Kaufmann, M.E.; Deplano, A.; de Ryck, R.; Struelens, M.; Zinn, C.E.; Fussing, V.; Salmenlinna, S.; Vuopio-Varkila, J.; El Solh, N.; Cuny, C.; Witte, W.; Tassios, P.T.; Legakis, N.; van Leeuwen, W.; van Belkum, A.; Vindel, A.; Laconcha, I.; Garaizar, J.; Haeggman, S.; Olsson-Liljequist, B.; Ransjö, U.; Coombes, G.; Cookson, B.: Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 european laboratories and its application for tracing the spread of related strains. J. Clin. Microbiol. : 41(4): 1574-1585; 2003
- Oliveira, D.C.; Crisostomo, I.; Santos-Sanches, I.; Major, P.; Alves, C.R.; Aires-de-Sousa, M.; Thege, M.K.; de Lencastre, H.: comparison of DNA sequencing of the Protein A gene polymorphic region with other molecular typing techniques for

- typing two epidemiologically diverse collections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. : 39(2): 574-580; 2001
- Panlilio, A.L.; Culver, D.H.; Gaynes, R.P.; Banerjee, S.; Henderson, T.S.; Tolson, J.S.; Martone, W.J.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. Infect. Control Hosp. Epidemiol. : 13(10): 582-586; 1992
- Peacock, S.J.; de Silva, G.D.; Justice, A.; Cowland, A.; Moore, C.E.; Winearls, C.G.; Day, N.P.: Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. J. Clin. Microbiol. : 40(10): 3764-3770; 2002
- Pulverer G. : *S.aureus*-Gruppen. In: Köhler Eggers, Fleischer, Medizinische Mikrobiologie (8th) Urban & Fischer Verlag München, Jena: 250-257; 2001
- Saulnier, P.; Bourneix, C.; Prevost, G.; Andremont, A.: Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. : 31(4): 982-985; 1993
- Shopsin, B.; Gomez, M.; Montgomery, S.O.; Smith, D.H.; Waddington, M.; Dodge, D.E.; Bost, D.A.; Riehman, M.; Naidich, S.; Kreiswirth, B.N.: Evaluation of Protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. : 37(11): 3556-3563; 1999
- Shopsin, B.; Gomez, M.; Waddington, M.; Riehman, M.; Kreiswirth, B.N.: Use of coagulase Gene (*coa*) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. : 38(9): 3453-3456; 2000
- Shopsin, B.; Kreiswirth, B.N.: Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. : 7(2): 323-326; 2001
- Spratt, B.G.: Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. Curr. Opin. Microbiol. : 2(3): 312-316; 1999
- Tang, Y.W.; Waddington, M.G.; Smith, D.H.; Manahan, J.M.; Kohner, P.C.; Highsmith, L.M.; Li, H.; Cockerill, F.R., III; Thompson, R.L.; Montgomery, S.O.; Persing, D.H.: Comparison of Protein A Gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. : 38(4): 1347-1351; 2000
- Tenover, F.C.; Arbeit, R.; Archer, G.; Biddle, J.; Byrne, S.; Goering, R.; Hancock, G.; Hebert, G.A.; Hill, B.; Hollis, R. : Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. : 32(2): 407-415; 1994
- Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Mickelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H.; Swaminathan, B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. : 33(9): 2233-2239; 1995

- Tenover, F.C.; Weigel, L.M.; Appelbaum, P.C.; McDougal, L.K.; Chaitram, J.; McAllister, S.; Clark, N.; Killgore, G.; O'Hara, C.M.; Jevitt, L.; Patel, J.B.; Bozdogan, B.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* : 48(1): 275-280; 2004
- Tiemersma, E.W.; Bronzwaer, S.L.; Lyytikäinen, O.; Degener, J.E.; Schrijnemakers, P.; Bruinsma, N.; Monen, J.; Witte, W.; Grundman, H.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg. Infect. Dis.* : 10(9): 1627-1634; 2004
- Tomasz, A.; Drugeon, H.B.; de Lencastre, H.M.; Jabes, D.; McDougall, L.; Bille, J.: New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob. Agents Chemother.*: 33(11): 1869-1874; 1989
- Vogel U. : *Spa*-Typisierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Stämmen am Universitätsklinikum Würzburg. *Der Mikrobiologe*: 15Jg. 2005: 131-135; 2005
- Vriens, M.R.; Blok, H.E.; Gigengack-Baars, A.C.; Mascini, E.M.; van der, W.C.; Verhoef, J.; Troelstra, A.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among patients after hospital discharge. *Infect. Control Hosp.Epidemiol.* : 26(7): 629-633; 2005
- Walker, J.; Borrow, R.; Edwards-Jones, V.; Oppenheim, B.A.; Fox, A.J.: Epidemiological characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in the north west of England by Protein A (*spa*) and coagulase (*coa*) gene polymorphisms. *Epidemiol. Infect.* : 121(3): 507-514; 1998
- Wernitz, M.H.; Keck, S.; Swidsinski, S.; Schulz, S.; Veit, S.K.: Cost analysis of a hospital-wide selective screening programme for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriers in the context of diagnosis related groups (DRG) payment. *Clin. Microbiol. Infect.* : 11(6): 466-471; 2005a
- Wernitz, M.H.; Swidsinski, S.; Weist, K.; Sohr, D.; Witte, W.; Franke, K.P.; Roloff, D.; Ruden, H.; Veit, S.K.: Effectiveness of a hospital-wide selective screening programme for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriers at hospital admission to prevent hospital-acquired MRSA infections. *Clin. Microbiol. Infect.* : 11(6): 457-465; 2005b
- Whitby, M.; McLaws, M.L.; Berry, G.: Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta-analysis. *Med. J. Aust.*: 175(5): 264-267; 2001
- Witte, W.; Bräulke, C.; Cuny, C.; Strommenger, B.; Werner, G.; Heuck, D.; Jappe, U.; Wendt, C.; Linde, H.J.; Harmsen, D.: Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with panton-valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* : 24(1): 1-5; 2005
- Witte, W.; Bräulke, C.; Heuck, D.; Cuny, C.: Analysis of nosocomial outbreaks with multiply and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany: implications for hospital hygiene. *Infection*: 22 Suppl 2: S128-S134; 1994

## **7.5. Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Bien, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Geus, Görg, Gotzen, Grau, Griss, Gudermann, Happle, Hasilik, Heeg, Hofmann, Höffken, Hoyer, Jungclas, Kann, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lill, Löffler, Maisch, Mandek, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Oertel, Rausch, Remschmidt, Renz, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Seitz, Seyberth, Steiniger, Struder, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Wilke, Wirth, Wulf, Zielke

## **7.6. Danksagungen**

Ganz herzlich danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Professor Mutters. Er hat es mir ermöglicht die Arbeit zu erstellen. Neben der Überlassung des Themas betreute er die Arbeit mit seiner engagierten und kompetenten Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Martina Kerwat, die mich bei allen Problemen der Dissertation sowohl fachlich als auch freundschaftlich unterstützte. Mit ihren sachkundigen Ratschlägen, der Diskussionsbereitschaft und der Motivation hat sie an der Fertigstellung dieser Arbeit einen erheblichen Anteil beigetragen.

Des Weiteren möchte ich dem Labor für Mikrobiologie- und Krankenhaushygiene für die große Offenheit und freundliche Atmosphäre danken, insbesondere Sandra Oppen, die mich in sämtliche Laborarbeiten einführte und mir bei technischen Schwierigkeiten mit ihrer Hilfsbereitschaft beiseite stand.

Jörn Henning Suthues danke ich dafür, mir sowohl computertechnisch als auch moralisch den Rücken freigehalten zu haben.

Danken möchte ich auch Thea Suthues für die Stunden des Lesens der Arbeit und die Überprüfung der Rechtschreibung.

Ich möchte mich bei meiner Familie für die emotionale Unterstützung während meiner ganzen Ausbildung bedanken. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, Monika Wewers, die mir während des gesamten Studiums und bei der Durchführung der Arbeit seelisch und finanziell stets zur Seite stand sowie meinem verstorbenen Vater, Hans-Georg Wewers, der mich gelehrt hat, meinen Weg zu gehen.